

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE SILVANO

**CARACTERIZAÇÃO DO RNA DUPLA FITA EM *Guignardia citricarpa* E
VALIDAÇÃO DO PROTOCOLO DE CURA**

CURITIBA

2008

CAROLINE SILVANO

**CARACTERIZAÇÃO DO RNA DUPLA FITA EM *Guignardia citricarpa* E
VALIDAÇÃO DO PROTOCOLO DE CURA**

Monografia apresentada à disciplina Estágio em
Genética como requisito parcial à obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vanessa Kava-Cordeiro

CURITIBA

2008

Aos meus pais, Ilda e Valdir,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pela vida e oportunidade de estudar.

Agradeço a todas as pessoas que incentivaram e contribuíram para a realização deste trabalho, e, em especial:

Aos meus queridos pais, Ilda Daminelli Silvano e Valdir Silvano, pelo amor, incentivo, paciência, e pelos muitos sonhos realizados. Muito obrigada.

Ao meu irmão Clecio e minha cunhada Carol, pelo amor, amizade e pelas muitas vezes que me aconselharam e me estimularam.

A toda minha família pelo apoio e incentivo.

Ao André pela companhia, pelo grande incentivo e por tornar esse momento mais feliz.

A todos os meus amigos, pelo carinho, apoio e incentivo.

À Camila, que compartilhou comigo o “desespero” dos finais de semestre, além de muitos momentos descontraídos.

À Juliana Fabris pela amizade, paciência de me ensinar, e auxílio com o PCR *multiplex*.

Aos meus colegas de laboratório, pela ótima convivência e amizade. Em especial aos colegas Josiane, Rosana, Douglas M. e Danyelle, por me ensinarem muito durante a realização deste trabalho.

À Thabata, pela amizade e grande ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Lucinir, pela amizade e valiosas sugestões.

Às professoras Lygia e Chirlei pela ótima convivência e auxílios no LabGeM.

À professora Vanessa, pela excelente orientação, amizade, estímulo e bons conselhos. Muito Obrigada.

RESUMO

O fungo *Guignardia citricarpa* é um fitopatógeno de extrema importância para a citricultura brasileira, por ser o agente causal da Mancha Preta dos Citros (MPC). Recentemente, foi relatada a infecção por vírus de RNA dupla-fita (RNA_{df}) em diferentes linhagens dessa espécie. Algumas dessas linhagens foram submetidas à cura deste RNA_{df} por meio de repiques sucessivos de ponta de hifa, após incubação por 21 dias com temperatura moderadamente elevada para este gênero (37°C), a fim de evidenciar a influência deste elemento nestes fungos. Com este tratamento foram obtidas colônias aparentemente curadas. Este trabalho teve como objetivos obter isolados de *G. citricarpa* de plantas cítricas da região de Paranavaí-PR; identificar ao nível de espécie os isolados obtidos; detectar RNA_{df} nestes novos isolados; curar isolados de seu RNA_{df}; avaliar a eficácia da técnica de repiques sucessivos de ponta de hifa associada à temperatura moderadamente elevada (37°C) para a cura de RNA_{df} do fungo *G. citricarpa* e avaliar metodologias para detectar linhagens compatíveis de *G. citricarpa*, para identificar possível transferência horizontal do RNA_{df}. Após três etapas de isolamento de citros foi obtido um isolado de *Guignardia* e vários fungos de outros gêneros. Este isolado foi identificado como *G. citricarpa* por meio de características morfológicas macroscópicas e microscópicas e também por teste do halo em meio aveia. Também foi feita uma *PCR* ("Polymerase Chain Reaction") do tipo "multiplex", com *primers* espécie-específicos para *G. citricarpa* e *G. mangiferae* com resultado positivo de amplificação para *G. citricarpa*. Este isolado foi submetido a uma purificação de ácidos nucleicos e após a eletroforese, uma banda semelhante à descrita anteriormente de RNA_{df} foi visualizada. No entanto, seis meses depois, uma nova purificação foi realizada e a banda extra não foi mais observada na eletroforese. Acredita-se que o não aparecimento dessa banda é resultado de uma baixa titulação de moléculas de RNA_{df}. O processo de cura deste isolado ainda está em andamento. As colônias curadas, obtidas anteriormente por outros autores, foram submetidas a novas extrações de ácidos nucleicos totais para avaliar a eficácia do protocolo utilizado. Em algumas linhagens consideradas curadas, foi possível observar novamente uma banda extra, com tamanho semelhante à banda anteriormente identificada como de RNA_{df}. Nestes casos, ao invés da cura completa, deve ter ocorrido uma diminuição na titulação das moléculas de RNA_{df} durante o tratamento que não foi detectada na eletroforese. Com o tempo, ocorreu um aumento significativo no número destas partículas virais, o que tornou novamente possível a visualização da banda de RNA_{df}. Estes resultados mostram que a eletroforese em gel de agarose 1% para detectar a presença de RNA_{df} pode não ser um método eficiente, sendo necessário a utilização de outras técnicas mais precisas. O teste de compatibilidade vegetativa foi feito pelo crescimento pareado em placa de Petri, deixando a distância de 2 ou 1 centímetros entre os inóculos que sempre foram de uma linhagem com RNA_{df} e outra sem. Em todos os ensaios foi possível identificar o encontro das hifas, porém não foram observadas anastomoses entre as hifas.

Palavras-chave: Mancha Preta dos Citros. *Guignardia citricarpa*. RNA dupla fita. Cura do RNA dupla fita.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADRO 1 –	HOSPEDEIRO, ANO E LOCAL DE ISOLAMENTO DAS LINHAGENS UTILIZADAS DE <i>Guignardia citricarpa</i> e <i>Guignardia mangiferae</i>	23
FIGURA 01 –	MORFOLOGIA DO ISOLADO ECLaP (<i>Guignardia</i> spp) EM MEIO AVEIA APÓS 7 DIAS.....	37
FIGURA 02 –	PRODUTOS DA REAÇÃO DO <i>PCR multiplex</i> DO ISOLADO ECLaP (<i>Guignardia</i> spp) COM OS <i>primers</i> GCP1/GCP2 e GMF1/GMR2.....	38
FIGURA 03 –	ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS DO ISOLADO ECLaP DA ESPÉCIE <i>G. citricarpa</i> , PARA A DETECÇÃO DE RNAdf.....	40
FIGURA 04 –	ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS DAS COLÔNIAS DE LINHAGENS DE <i>G. citricarpa</i> APÓS TRATAMENTO PARA CURA DO RNAdf.....	44
FIGURA 05 –	ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS DAS COLÔNIAS CURADAS DE LINHAGENS DE <i>G. citricarpa</i> APÓS VÁRIOS MESES....	44
FIGURA 06 –	COMPATIBILIDADE ENTRE LINHAGENS DE <i>G. citricarpa</i> APÓS 4 DIAS DE CRESCIMENTO EM MEMBRANA DE CELOFANE SOBRE MEIO CITROS.....	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 OBJETIVOS.....	9
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	10
3.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS E FITOPATOGÊNICOS.....	10
3.2 O GÊNERO <i>Guignardia</i>	12
3.3 MANCHA PRETA DOS CITROS.....	14
3.4 RNA DUPLA FITA.....	17
3.5 CURA DO RNA DUPLA FITA EM FUNGOS.....	21
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 LINHAGENS UTILIZADAS.....	23
4.2 MEIOS DE CULTURA.....	24
4.2.1 Meio BDA– Batata-Dextrose-Ágar.....	24
4.2.2 Meio Citros FN (NISHIMURA, 2008, com modificações).....	24
4.2.3 Meio Aveia.....	25
4.3 SOLUÇÕES E REAGENTES.....	25
4.3.1 Solução Estoque de Tetraciclina.....	25
4.3.2 <i>Taq</i> DNA polimerase.....	25
4.3.3 Desoxirribonucleotídeos (dNTPs).....	26
4.3.4 Tampão de Extração de DNA (RAEDER; BRODA, 1985).....	26
4.3.5 Fenol.....	26
4.3.6 Clorofane.....	27
4.3.7 Clorofil.....	27
4.3.8 Solução Tris-HCl 1 M pH 8,0 (solução estoque).....	27
4.3.9 Solução EDTA 0,5 M pH 8,0 (solução estoque).....	27
4.3.10 Tampão TBE 5x (solução estoque).....	27
4.3.11 Gel de Agarose (1,0%).....	28
4.3.12 Gel de Agarose (1,5%).....	28
4.3.13 Solução de brometo de etídio.....	28
4.4 PREPARO DE MATERIAL.....	29
4.4.1 Esterilização.....	29
4.4.2 Incubação.....	29
4.5 ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	29
4.5.1 Isolamento de fungos endofíticos.....	29
4.5.2 Identificação dos fungos endofíticos.....	30
4.5.2.1 <i>Teste do halo em meio aveia</i>	31
4.5.2.2 <i>Reação de PCR multiplex</i>	31
4.6 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS.....	32
4.7 ELETROFORESE.....	33
4.8 RNA DUPLA FITA.....	34
4.8.1 Detecção de RNA dupla fita.....	34
4.8.2 Cura do RNA dupla fita.....	34
4.8.3 Confirmação da cura do RNAdf.....	35
4.8.4 Teste de compatibilidade vegetativa.....	35

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS	36
5.1.1 Isolamento de fungos endofíticos	36
5.1.2 Identificação dos fungos	36
5.1.2.1 <i>Teste do halo em meio aveia</i>	36
5.1.2.2 <i>Reação de PCR multiplex</i>	37
5.2 RNA DUPLA FITA	39
5.2.1 Detecção do RNA dupla fita	39
5.2.2 Cura do RNA dupla fita	41
5.2.3 Confirmação da cura do RNA dupla fita	43
5.2.4 Teste de compatibilidade vegetativa	46
6 CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

Fungos endofíticos são aqueles que vivem no interior de plantas durante todo o seu ciclo de vida ou parte dele, sem causar, aparentemente, qualquer dano aos seus hospedeiros. Eles distinguem-se dos fitopatogênicos, que causam doenças nas plantas.

A espécie *Guignardia citricarpa* é fitopatogênica, responsável pela Mancha Preta dos Citros (MPC). A MPC é uma doença importante para a agricultura brasileira, pois causa prejuízos na exportação de frutas cítricas frescas no mercado interno e principalmente no mercado internacional. Os prejuízos são devidos à depreciação comercial dos frutos, que apresentam lesões escuras em suas cascas. No entanto, *G. citricarpa* não libera nenhuma toxina conhecida e não há malefícios em se ingerir a fruta ou o suco da mesma.

Recentemente, foi relatada a infecção por vírus de RNA dupla-fita (RNA_{df}) em diferentes linhagens de *G. citricarpa*. Estudos mostram que a infecção por RNA_{df} em fungos pode estar associada a diferentes mudanças morfológicas e fisiológicas, incluindo alterações citológicas, mudanças na morfologia da colônia, taxa de crescimento e esporulação de seus hospedeiros, além de alterações na patogenicidade, causando principalmente hipovirulência.

O significado biológico dessas micoviroses, incluindo sua influência na patogenicidade e/ou influência no fenótipo do hospedeiro, ainda é incerto para a espécie *G. citricarpa*. Para a compreensão da real influência, é necessário obter linhagens livres de RNA dupla fita (linhagens curadas) para efetuar comparações entre linhagens isogênicas, quanto às possíveis alterações morfológicas, quanto à capacidade de colonização de seus hospedeiros, e até mesmo alterações na patogenicidade da espécie *G. citricarpa*.

O estudo da influência das moléculas de RNA_{df} em *G. citricarpa* é importante para avaliar o potencial de controle biológico para a MPC, a fim de diminuir o uso de agrotóxicos e os conseqüentes danos ao meio ambiente.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal contribuir para o conhecimento da biologia do fungo *Guignardia citricarpa*, agente causal da Mancha Preta dos Citros. Como objetivos específicos, seguem:

- Obter isolados de *G. citricarpa* de plantas cítricas da região de Paranavaí-PR;
- Identificar ao nível de espécie os isolados obtidos, por meio de características morfológicas macroscópicas e microscópicas e também por teste do halo em meio aveia, e *PCR* ("Polymerase Chain Reaction") *multiplex*, com *primers* espécie-específicos;
- Detectar RNA dupla fita (RNA_{df}) nestes novos isolados;
- Caracterizar os RNA_{df} por meio de eletroforese em gel de agarose;
- Tentar a cura de RNA_{df}, quando presente nos novos isolados;
- Avaliar a eficácia da técnica de repiques sucessivos de ponta de hifa associada à temperatura moderadamente elevada (37°C) para a cura de RNA_{df} no fungo *G. citricarpa*;
- Avaliar metodologias para detectar linhagens compatíveis de *G. citricarpa*, visando identificar possível transferência horizontal do RNA_{df}.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS E FITOPATOGENICOS

De acordo com Petrini (1991), fungos endofíticos são aqueles capazes de colonizar tecidos internos da planta, sem causar dano aparente a seu hospedeiro. Já os fungos fitopatogênicos são apontados como causadores de várias doenças em vegetais (STONE, 1998; CARROLL, 1988; MOORE-LANDECKER, 1996).

Petrini (1986) encontrou fungos endofíticos em todas as espécies vegetais estudadas e concluiu que todas as plantas vivas podem, potencialmente, ser hospedeiras destes fungos.

É sabido que bactérias e fungos podem viver endofiticamente em diferentes partes das plantas, como raízes, ramos, folhas, sementes, frutos, tubérculos e mesmo flores, colonizando os espaços intercelulares, vasos do xilema ou mesmo apresentando colonização intracelular (MUNDT; HINKLE, 1976; GARBEVA *et al.*, 2001; STURZ *et al.*, 1999; DARBYSHIRE e GREAVES, 1971; HALLMANN *et al.*, 1997), em diversas culturas de importância agrônômica como milho, algodão, tomate, batata, citros e videira dentre outras (BELL *et al.*, 1995b; JACOBS *et al.*, 1985; HINTON; BACON, 1995; QUADT-HALLMANN *et al.*, 1997).

Os microrganismos endofíticos penetram nos tecidos vegetais de seus hospedeiros pelos estômatos e raízes, ferimentos ou cicatrizes, ou ainda através da secreção de enzimas hidrolíticas (SPÓSITO; AZEVEDO, 2004). A penetração pode ocorrer por meio de esporos levados pelo vento ou hifas que invadem os tecidos. Muitos endófitos produzem massas de conídios delgados, característica associada com a dispersão por chuvas (RIBEIRO, 1995). Outra forma de propagação se dá pela transmissão vertical por meio de sementes (WHITE Jr; MORGAN-JONES; MORROW, 1993; CLAY, 2004).

A presença de endófitos no interior de tecidos vegetais pode ser demonstrada por meio de microscopia óptica (WHITE Jr.; MORGAN-JONES; MORROW, 1993) ou eletrônica (VIRET; PETRINI, 1994), ou ainda por isolamento de fungos endofíticos. Para o isolamento, devem-se usar meios de cultura apropriados, de acordo com o grupo de endófitos que se deseja isolar. No caso de fungos, o ideal

é acrescentar substâncias seletivas, como antibióticos, que inibem o crescimento de bactérias. Outro cuidado imprescindível para o processo de isolamento consiste na remoção da microbiota epifítica e de outros contaminantes externos da superfície das folhas, pecíolos e sementes (MOORE-LANDECKER, 1996).

Os modelos de interação fungo endofítico e planta certamente ainda não são totalmente conhecidos, mas vários fatores envolvidos na colonização da planta devem ser comuns às linhagens fitopatogênicas. O sucesso da penetração na planta hospedeira pela maioria dos fungos, patogênicos ou não, depende da diferenciação do micélio em estruturas especializadas, denominadas de apressórios (KUBO *et al.*, 1996). Algumas espécies de *Colletotrichum*, *Magnaporthe* e *Phyllosticta* produzem apressório complexo e fortemente pigmentado com melanina (SHAW; KUO; HOCH, 1998). Este pigmento media a formação de uma pressão hidrostática essencial para a ação mecânica do apressório (HOWARD; FERRARI, 1989; BOURETT; HOWARD, 1990). O tratamento de conídios com inibidores de síntese de melanina como Triciclazol e Piroquilon, resulta na produção de apressórios não pigmentados e não funcionais, acarretando a incapacidade do fungo penetrar na planta (WOLOSHUK; SISLER, 1982; BELL; WHEELER, 1986; DEAN, 1997).

Ainda não existe uma distinção exata entre microrganismos epifíticos, endofíticos e fitopatogênicos. Segundo Azevedo (1998), um microrganismo epifítico pode, eventualmente, ser encontrado dentro de um vegetal; um endofítico, em certas condições, pode tornar-se um patógeno e um patógeno, em determinadas condições, não afeta o seu hospedeiro, podendo ser considerado um endofítico.

O isolamento de fungos endofíticos pertencentes a espécies historicamente fitopatogênicas tem levado ao uso do termo “endofitismo” como sinônimo de latência, presumindo que alterações nas condições microambientais levariam ao surgimento de sintomas, sugerindo assim transições entre os estados endofítico e patogênico. Este é o caso de alguns sistemas plantas-microrganismos, mas não pode ser considerado regra (KAVA-CORDEIRO, 2004).

Blanco (1999) identificou, em *G. citricarpa*, um marcador molecular do tipo exclusivo de linhagens patogênicas de citros, o qual foi clonado e seqüenciado. Esta seqüência aparentemente não é codificadora e, a partir dela, foi desenhado um par de oligonucleotídeos iniciadores para amplificar esta seqüência por PCR. Desta forma, linhagens de *G. citricarpa* podem ser identificadas e com a utilização destes oligonucleotídeos iniciadores existe a possibilidade de um diagnóstico rápido de

plantas infectadas com linhagens patogênicas deste fungo, mesmo antes do aparecimento das lesões que caracterizam a doença. Outra consideração importante da autora a respeito da diferenciação de linhagens endofíticas (não patogênicas) e linhagens patogênicas de *Guignardia* spp é baseada em agrupamentos obtidos a partir de dados gerados por RAPD. O fato de linhagens endofíticas isoladas de citros agruparem juntamente com linhagens patogênicas de goiabeira (*G. psidii*) levou à sugestão de que estes endofíticos não são patógenos latentes do hospedeiro de onde foram isolados e sim patógenos de outras espécies vegetais, incapazes de causar doenças no hospedeiro do qual foram isolados.

3.2 O GÊNERO *Guignardia*

O gênero *Guignardia*, descrito em 1892 por Viala e Ravaz, compreende as formas teleomórfas de espécies de *Phyllosticta* e de alguns outros gêneros relacionados de fungos mitospóricos geralmente saprófitos ou semiparasitas de folhas (SIVANESAN, 1984).

Okane, Nakagiri e Ito (2001) isolaram fungos do gênero *Guignardia* (anamorfo: *Phyllosticta*) de folhas sadias de plantas da família Ericaceae. Morfologicamente, o anamorfo *Phyllosticta*, apresentou-se muito semelhante à espécie *P. capitalensis* P. Henn., conhecido como patogênico de orquídeas. Dados de seqüenciamento de regiões ITS1 e ITS2 ("internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA"), incluindo 5,8S rDNA, demonstraram a identidade dos isolados com *P. capitalensis*. Com estes resultados, os autores descreveram o endofítico ascomiceto como a nova espécie *Guignardia endophyllicola*, cujo anamorfo correspondente é *Phyllosticta capitalensis*. Previamente descrito apenas como patógeno de orquídeas, este fungo foi comprovadamente identificado como endofítico de plantas da família Ericaceae. Também Pandey, Reddy e Suryanarayanan (2003) caracterizaram linhagens de *Phyllosticta* isoladas de folhas de árvores tropicais por meio de análise de ITS-RFLP e seqüenciamento de regiões ITS e identificaram estes isolados como *P. capitalensis*. Desta forma, comprovaram que este fungo, apesar de inicialmente descrito como patógeno de orquídeas, pode ser encontrado como endofítico de várias espécies vegetais.

Acreditava-se que *G. citricarpa* poderia ser encontrado como patógeno em lesões e de forma assintomática em plantas de citros saudáveis. Entretanto, em 1999 Blanco comparou geneticamente, por meio de marcadores de RAPD, linhagens de populações patogênicas e endofíticas de *Guignardia* spp de diversas regiões e hospedeiros. Constatou-se a existência de três populações de *Guignardia* spp geneticamente muito diferentes coexistindo em citros, sendo duas endofíticas e uma patogênica, sugerindo que talvez estas três populações pudessem pertencer a espécies distintas. O desenvolvimento de um par de oligonucleotídeos iniciadores capazes de amplificar um fragmento de 370 pb, específico para linhagens patogênicas de *G. citricarpa*, veio a corroborar para distinção genética entre estes grupos (GLIENKE *et al.*, 2008).

A espécie *Guignardia mangiferae* (*Phyllostictina mangiferae*) tem sido descrita na literatura como sendo o agente causal de necrose em folhas de manga (MENEZES; OLIVEIRA, 1993), apresentando características morfológicas extremamente semelhantes às observadas em *G. citricarpa*, o que tem dificultado a identificação de frutos e folhas assintomáticos.

Em 2002, Baayen *et al.* compararam dezenas de linhagens patogênicas e endofíticas de *Guignardia* spp, *Phyllosticta* spp e *G. citricarpa* isoladas de diferentes espécies vegetais de diversas regiões da Ásia, África, Austrália e América. Foram utilizados dados morfológicos e também moleculares (seqüências ITS e AFLP). Os dados morfológicos obtidos estão de acordo com os descritos por McOnie (1964a), em que linhagens patogênicas apresentam crescimento lento em comparação com linhagens endofíticas, que apresentam crescimento mais rápido e fácil produção de peritécio e ascósporos em meio de cultura. Com os dados moleculares foi possível agrupar os isolados estudados em quatro grupos. Os grupos I e II foram os mais numerosos, sendo que no grupo I ficaram os isolados (38 no total) de lesão de citros (mancha preta), com crescimento mais lento e que foram então, identificados como *G. citricarpa*. No grupo II (43 isolados), os dados moleculares apontaram para uma grande identidade destes isolados com o fungo *G. mangiferae*, sendo que estes isolados eram provenientes de citros e também de outras plantas assintomáticas ou com sintomas bem discretos (pequenas manchas). Com base nestes dados, estes isolados foram classificados como *G. mangiferae*. Os grupos III e IV apresentaram apenas um isolado cada e os dados moleculares apontaram para as espécies *Phyllosticta telopeae* e *P. spinarum*, respectivamente.

Stringari (2004), utilizando características morfológicas e dados moleculares de marcadores RAPD e seqüenciamento da região ITS1 e ITS2 do rDNA, analisou a variabilidade genética entre linhagens patogênicas de *G. citricarpa* (isoladas de lesões da MPC) e linhagens endofíticas de *Phyllosticta* sp e *G. mangiferae* (isoladas de folhas assintomáticas) de diversas regiões e hospedeiros (citros, erva-mate, goiabeira e mangueira). A alta similaridade genética entre os isolados endofíticos, sugeriu a identificação como *G. mangiferae* (Anamorfo: *Phyllosticta capitalensis*), corroborando com os estudos anteriores, onde foram utilizados marcadores RAPD (CHRISTO, 2002), seqüências ITS e dados de AFLP (BAAYEN, 2002).

Apesar desses ajustes na classificação do gênero *Guignardia*, vários autores têm demonstrado, por meio de marcadores de RAPD, um alto grau de variabilidade genética intraespecífica. Tem sido observado alto grau de variabilidade genética entre linhagens isoladas de lesão de Mancha Preta dos Citros (MPC), ou seja, linhagens patogênicas (BLANCO, 1999; CHRISTO, 2002) como também entre linhagens isoladas em plantas assintomáticas, ou seja, endofíticas (GLIENKE-BLANCO *et al.*, 2002; CHRISTO, 2002).

As revisões na classificação do gênero *Guignardia* têm uma grande importância econômica, devido às restrições alfandegárias na exportação de frutos de citros *in natura*. A União Européia, por exemplo, apresenta leis fitossanitárias específicas para fungos fitopatogênicos de citros, e não permite a entrada de frutos infectados com esses fungos. A legislação de quarentena da União Européia refere-se apenas às linhagens patogênicas de *G. citricarpa*, no entanto, há uma enorme dificuldade em diferenciar as espécies não patogênicas. Assim, a classificação de linhagens endofíticas, mesmo que isoladas de citros como pertencentes a uma espécie não patogênica, é uma informação bastante relevante para exportações dos frutos, já que estes fungos não seriam enquadrados como fitopatógenos de citros.

3.3 MANCHA PRETA DOS CITROS

A citricultura brasileira é uma atividade agroindustrial de alta relevância socio-econômica para o país. A área plantada está ao redor de 1 milhão de hectares e a produção de frutas supera 19 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2008). Grande

parte desta produção é destinada à industrialização, como produção de suco concentrado de laranja. O Brasil é o maior exportador de suco concentrado congelado de laranja, cujo valor das exportações, juntamente com as de outros derivados, tem gerado cerca de 1,5 bilhões de dólares anuais. Além disso, o setor citrícola brasileiro gera muitos empregos (EMBRAPA, 2008).

Embora os dados econômicos e sociais demonstrem a importância da citricultura para o país, o setor se ressentido dos efeitos de problemas fitossanitários, que são fatores de grande preocupação por elevarem o risco da atividade, comprometendo toda a cadeia produtiva (BALDASSARI, 2006). Entre as principais doenças que atualmente afetam a cultura do citrus no Brasil estão: Cancro Cítrico, Clorose Variegada dos Citros, Declínio, Gomose de *Phytophthora*, *Greening*, Leprose dos Citros, Mancha de Alternária; Mancha Preta dos Citros; Morte Súbita dos Citros, Rubelose, Podridão Floral dos Citros, Rubelose e Tristeza (FUNDECITRUS, 2008).

A Mancha Preta dos Citros (MPC), causada pelo fungo *Guignardia citricarpa*, afeta todas as variedades de laranjas doces, limões verdadeiros, tangerinas e híbridos. Nunca foram observados sintomas da doença em frutos de lima ácida Tahiti (FUNDECITRUS, 2008). A MPC caracteriza-se por apresentar lesões com bordas salientes e com depressão no centro, onde se observam pequenos pontos pretos, os picnídios. As lesões podem atingir os frutos maduros ou no início de maturação, podendo aparecer após a colheita, no transporte e armazenamento (ROBBS; BITTENCOURT, 1995).

As lesões causadas pela MPC restringem-se praticamente à casca dos frutos e não provoca o apodrecimento dos mesmos, mas é responsável pela sua depreciação comercial para o mercado de frutas frescas (BALDASSARI, 2006). Apesar da depreciação comercial, os frutos lesados podem ser aproveitados pelas indústrias de suco concentrado. Outro problema relacionado à MPC é a queda acentuada dos frutos, causada por lesões mais severas (FUNDECITRUS, 2008).

A MPC é considerada uma doença quarentenária para os países da União Européia e para os Estados Unidos, e classificada como nível A1, causando elevada restrição às exportações dos frutos *in natura*, seja devido à dificuldade de habilitação de pomares livres da doença, seja devido aos elevados custos para monitoramento e controle da qualidade fitossanitária requerida (BALDASSARI, 2006).

O primeiro relato da doença ocorreu em 1895 na Austrália, a qual ocasionou elevadas perdas na produção e pós-colheita. Por volta da década de 30, a enfermidade foi encontrada na região litorânea da província de Transvaal, tornando impróprios para a exportação mais de 90% dos frutos de pomares não protegidos (ROBBS, 1990). Hoje, a MPC apresenta uma ampla distribuição geográfica, já tendo sido registrada na África, Ásia, Oceania, América Central, América do Sul e Antilhas (ROBBS; BITTENCOURT, 1995).

No Brasil, o primeiro relato da doença ocorreu em 1940, em frutos coletados em Piracicaba, São Paulo. Em 1980 a doença ressurgiu no Rio de Janeiro, afetando Mexerica do Rio (ROBBS; PIMENTEL; RIBEIRO, 1980). No início da década de 90 a MPC foi identificada atingindo o município de Conchal, uma importante região citrícola do Estado de São Paulo (GOES; FEICHTENBERGER, 1993). A evolução e a distribuição geográfica da MPC ocorreram de forma muito rápida, e atualmente encontra-se, de forma endêmica, em mais de quarenta municípios produtores do Estado de São Paulo (BALDASSARI *et al.*, 2001). A doença também já foi relatada em outros estados, entre eles Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás, Espírito Santo, Santa Catarina, Amazonas e Paraná (FEICHTENBERGER, 2007).

No Paraná, a MPC foi relatada primeiramente em 2004, no município de Cerro Azul, região do Vale do Ribeira (NUNES *et al.*, 2006), onde a produção de tangerinas é predominante da agricultura familiar, e sofre com a queda de produtividade dos pomares e com o aumento do custo de produção para o controle fitossanitário da doença.

As principais medidas de controle incluem a erradicação de plantas e frutos afetados; controle do mato nas linhas de plantio e ruas, de modo a produzir cobertura morta sobre o solo e reduzir a produção e a dispersão de esporos do fungo nas folhas em decomposição sobre a superfície do solo; manter as plantas em boas condições de nutrição e sanidade; e utilizar mudas livres da doença nos plantios e replantios, principalmente em locais onde a doença não foi ainda constatada (FEICHTENBERGER, 2007).

O controle químico com fungicidas não exerce um controle adequado da doença, além de ser antieconômico e nocivo ao meio ambiente. Porém, é necessário fazer uso de fungicidas quando a doença ataca de forma severa e quando a produção destina-se ao consumo da fruta fresca. O principal problema da utilização

sucessiva destes produtos é a seleção de linhagens resistentes, conforme observado na África do Sul (HERBERT; GRECH, 1985).

3.4 RNA DUPLA FITA

Moléculas de RNAs dupla fita (RNAdf) têm sido encontradas em uma grande variedade de fungos filogeneticamente diversos (ADLER-MOORE, 1985; KIM; BOZARTH 1985; NOGAWA *et al.* 1993). Na maioria dos casos, essas moléculas foram consideradas como um indicador da presença de elementos citoplasmáticos, os VLPs (“vírus-like particles”) (ADLER-MOORE 1985; BUCK, 1986). Pesquisas indicam que essas partículas virais estão presentes em, aproximadamente, 30% de todas as espécies de fungos (BUCK, 1986).

Micovírus com genoma de RNAdf são comuns em muitos fungos filamentosos. A maioria desses micovírus são encapsulados em partículas isométricas. Outros ocorrem como elementos não encapsulados associados com vesículas membranosas no citoplasma, ou como frações mitocondriais (CHU *et al.*, 2004).

Mertens (2004) relatou a existência de 7 famílias de vírus de RNAdf: Hypoviridae, Totiviridae, Partitiviridae, Chrysoviridae, Reoviridae, Birnaviridae e Cystoviridae, sendo que as 5 primeiras são encontradas em fungos. Essas famílias diferem entre si quanto ao número de segmentos de RNAdf apresentados, seqüências de aminoácidos das suas polimerases, tipo e tamanho da partícula viral, além da seqüência de nucleotídeos de seus materiais genéticos.

Para a detecção do RNAdf, deve ser utilizado um protocolo de extração de ácidos nucléicos totais e posterior visualização destes ácidos nucléicos em gel de agarose. Este método separa DNA, RNAdf e RNA de fita simples. A confirmação da natureza das bandas extras, quando encontradas, é feita por meio de tratamentos com DNase e RNase. Alguns fungos como o *Uncinula necator*, fitopatogênico e biotrófico obrigatório, exigem adaptações no protocolo convencional (DÉLYE; CORIO-COSTET, 1998).

Os micovírus são regularmente transmitidos horizontalmente entre indivíduos por contato citoplasmático, com fusão de hifas (anastomose), ou verticalmente

através de esporos, durante o desenvolvimento do fungo. Não é conhecida a transmissão extracelular de micovírus (BUCK 1986; WICKNER 1996). Segundo Buck (1986), os micovírus não têm habilidade de lisar as células do hospedeiro, sendo que o único mecanismo natural de transmissão é o citoplasmático. Isso reflete em uma gama limitada de hospedeiros, já que fungos filamentosos possuem um sistema de auto-reconhecimento geneticamente regulado que impede a fusão de hifas entre linhagens incompatíveis. Este sistema de incompatibilidade vegetativa, de acordo com McCabe, Pfeiffer e Van Alfen (1999), limita a transmissão dos micovírus através da reprodução sexual em populações fúngicas.

Deng *et al.* (2002) testaram a transmissão de RNAdf entre isolados infectados e não infectados de *Sclerotinia homoeocarpa*, e observaram que nos testes entre linhagens compatíveis a transmissão foi de 100%, enquanto que nos testes com linhagens não compatíveis a transmissão foi bem menor: 4,8% entre linhagens que formam um *gap* entre elas, e 36% entre linhagens que formam uma *line gap*. Com estes resultados, os autores concluíram que a incompatibilidade vegetativa pode reduzir a frequência de transmissão de RNAdf de isolados infectados para isolados não infectados. Anagnostakis e Day (1979) obtiveram 100% transmissão de hipovírus, no fungo *Endothia parasitica*. Cortesi *et al.* (2001) obtiveram resultados semelhantes para o fungo *Cryphonectria parasitica*.

Através da fusão de protoplastos, Pfeiffer *et al.* (2001) transferiram RNAdf para uma linhagem de *Phaffia rhodozyma* não portadora, e os efeitos desses elementos no valor adaptativo do hospedeiro foram testados por seguidas reproduções sexuais e assexuais. Os resultados não mostraram efeito na taxa de crescimento durante a fase lag e log da reprodução vegetativa, mas o número máximo de células na fase estacionária foi significativamente diferente. No entanto, na reprodução sexual, os resultados foram inconclusivos.

Geralmente, RNAs dupla fita são latentes ou crípticos mas, em alguns casos, fenótipos particulares são observados em fungos que contém esses micovírus (CASTRO *et al.*, 1999). A presença de certos elementos de RNAdf pode resultar em mudanças morfológicas e fisiológicas, incluindo alterações citológicas, mudanças na morfologia da colônia, taxa de crescimento e esporulação de seus hospedeiros (CHU *et al.*, 2004). Infecções por RNAdf podem, também, alterar na patogenicidade, causando principalmente hipovirulência (BOLAND, 1992; DALZOTO *et al.*, 2006).

Comparando linhagens de *Chalara elegans* que continham RNAdf quanto ao crescimento, patogenicidade e sobrevivência no solo, Punja (1994) verificou que a presença de múltiplos elementos de RNAdf no fungo estava associada com um aumento na esporulação, alteração da morfologia da colônia, redução no crescimento e na patogenicidade. Resultados semelhantes foram obtidos por Howitt *et al.* (1995), em *Botrytis cinerea*. Estes autores compararam várias linhagens contendo RNAdf com linhagens livres destes elementos e encontraram uma diferença na taxa de crescimento e virulência, sendo menores para o grupo contendo RNAdf. Castro *et al.* (1999) observaram neste mesmo fungo que células infectadas com vírus apresentaram um importante grau de degeneração celular em seu citoplasma, inclusive com o desaparecimento de organelas.

Dalzoto *et al.* (2006) obtiveram resultados interessantes com o entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Em bioensaio contra o percevejo marrom da soja, *Euschistus heros*, uma linhagem de *B. bassiana* com RNAdf foi menos virulenta que a isogênica, o que evidencia o caráter de hipovirulência do RNAdf neste fungo. No entanto, em geral, para fungos entomopatogênicos, o RNAdf leva à hipervirulência.

Chu *et al.* (2002) observaram a presença de RNAdf em linhagens de *Fusarium graminearum* e analisaram com mais detalhes uma destas linhagens, verificando mudanças morfológicas como redução do crescimento, aumento da pigmentação, redução da virulência para trigo e decréscimo na produção de toxinas. Além disso, o RNAdf foi transmitido para uma linhagem livre deste elemento por fusão de hifas e a linhagem receptora adquiriu o vírus associado ao fenótipo da linhagem doadora.

Satélites de certos RNA dupla fita são responsáveis pelo “sistema matador”, que fazem com que seu hospedeiro secrete toxinas como ocorre em *Saccharomyces cerevisiae* (WICKNER, 1992) e *Ustilago maydis* (SHELBOURN; DAY; BUCK, 1988). As “linhagens matadoras” contêm segmentos de RNAdf encapsulados que são responsáveis por informações requeridas para replicação e para a estrutura viral, e também por codificar polipeptídeos tóxicos e provavelmente, por um papel na imunidade do fungo para a toxina que o mesmo produz.

Com relação à organização do genoma desses RNAdf, Nogawa *et al.* (1996) verificaram atividade RNA polimerase dependente de RNA (“RDRP – RNA-dependent RNA polymerase”) no micovírus FUSO-V de *Fusarium solani*. Compel *et*

al. (1999) purificaram o micovírus – FUPO-1 – da linhagem A-11 de *Fusarium poae* e identificaram dois segmentos, um codificando para uma provável RDRP e o outro codificando para uma provável proteína de capsídeo (“coat protein”). A organização do genoma e certas seqüências de FUPO-1 mostraram similaridade ao vírus 2H de *Atkinsonella hypoxylon* e ao micovírus FUSO-V de *Fusarium solani*, membros da família Partitiviridae. Apesar de não ter sido possível estabelecer uma correlação entre compatibilidade vegetativa e RNA dupla fita, estes autores observaram, por meio de hibridizações, que em linhagens de *Fusarium poae* com compatibilidade vegetativa, RNAs dupla fita de tamanhos similares sempre eram geneticamente relacionados (muito similares ou homólogos) porém em linhagens que apresentavam incompatibilidade vegetativa, os RNAs dupla fita de tamanhos similares eram homólogos ou não.

A presença de RNAdf em fungos têm se tornado alvo de extensas pesquisas, especialmente em fitopatógenos em que há um grande potencial na utilização de RNAs dupla fita como agentes de controle biológico, utilizando a hipovirulência que estes vírus podem conferir a estes fungos.

Resultados favoráveis com a utilização de vírus no controle biológico de fungos fitopatogênicos vêm sendo obtidos com os vírus de hipovirulência de *Cryphonectria parasitica*, pelo cancro em castanheiras. Na Europa, esta doença vem sendo controlada pela disseminação de linhagens hipovirulentas (com vírus) e atualmente, lesões de cancro curadas estão sendo encontradas e investigadas. Em todas é confirmada a presença do RNA dupla fita do hipovírus (ROBIN; HEINIGER, 2001). Recentemente, Hoegger *et al.* (2003) comprovaram a disseminação dos vírus presentes nas linhagens infectadas em cancros previamente tratados com o fungo infectado com o vírus e também em novas lesões da doença, que não tinham sido tratadas anteriormente.

Recentemente foi relatada a existência de RNAdf e partículas semelhantes à vírus (VLPs – “Virus-like particles”) em *G. citricarpa*, *G. mangiferae* e *P. spinarum* (KAVA-CORDEIRO *et al.*, 2007), porém sem a obtenção de linhagens curadas, a possível influência destes elementos em seus hospedeiros ainda é incerta.

3.5 CURA DO RNA DUPLA FITA EM FUNGOS

Várias técnicas vêm sendo utilizadas para obter a cura do RNA dupla fita em fungos patogênicos de plantas ou animais.

Fulbright (1984) utilizou ciclohexamida para tentar curar o fungo *Endothia parasitica*, patogênico de castanheiras, e obteve a cura da linhagem GHU4, que determinou aumento na virulência e recuperação da morfologia típica da colônia. Segundo Stryer (1988), a ciclohexamida inibe a síntese de proteínas, pois inibe a atividade da peptidil-transferase da subunidade 60S do ribossomo e inibe a síntese de RNA, como foi visto na cura de outras espécies (BOTTACIN *et al.* 1994). Dalzoto *et al.* (2006) obtiveram resultados semelhantes para o fungo *Beauveria bassiana*.

Boland (1992) não obteve a cura do RNAdf em *Sclerotinia sclerotiorum*, utilizando subculturas de pontas de hifas e tratamento das colônias com calor ou ciclohexamida. O autor associou a hipovirulência do fungo com a presença do RNAdf. Robinson e Deacon (2001) também não obtiveram sucesso na cura total do RNAdf do fungo fitopatogênico *Rhizoctonia solani* (AG3) utilizando ciclohexamida com incubação prolongada de 8 semanas, nem com a técnica de subculturas de pontas de hifas.

Utilizando outra técnica na tentativa de eliminar o RNAdf de *Paecilomyces fumosoroseus*, fungo entomopatogênico, (AZEVEDO *et al.* 2000) obtiveram a cura em um dos isolados através do isolamento de colônias monospóricas. Este trabalho mostrou pela primeira vez que fragmentos de RNAdf não causaram efeitos de hipovirulência em *P. fumosoroseus*.

Em testes de cura com ciclohexamida ou emetina, Ahn e Lee (2001) perceberam que apenas com a eliminação de segmento 6,0 kb de RNAdf em *Nectria radicicola*, a fisiologia do fungo foi alterada e ocorreu uma diminuição da virulência, esporulação e pigmentação. Desta forma, o segmento 6,0 kb RNAdf é um regulador positivo na fisiologia deste fungo, diferentemente de outros trabalhos, em que a presença do RNAdf torna o fungo hipovirulento, como foi relatado por outros autores (FULBRIGHT 1984, BOLAND 1992).

Varga *et al.* (1998) obtiveram resultados variáveis para três técnicas de cura de RNAdf utilizadas em *Aspergillus sect. flavi*. Com ciclohexamida a cura ocorreu em 40% dos isolados com RNAdf. Usando a técnica de colônia monospórica seqüencial,

a freqüência de cura variou de 11 a 100% e com a técnica de clorato para seleção de mutantes para o metabolismo de nitrogênio, a freqüência de cura variou de 0 a 100%. Os autores ainda verificaram que a presença e/ou ausência de RNAdf não está associada à produção de aflatoxina.

Ikeda *et al.* (2004) testaram várias técnicas para curar totalmente os RNAdf dos basidiomicetos fitopatogênicos *Helicobasidium mompa* e *Rosellinia necatrix*. Testes com cicloexamida, incubação em temperatura elevada (40°C) e isolamento de ponta de hifa não foram eficientes na cura total do RNAdf. Os autores associaram a ineficiência do método de isolamento de ponta de hifa com o fato da duplicação do RNAdf ser bem sincronizada com o crescimento das hifas no hospedeiro. Entretanto, pela primeira vez, a reprodução sexual foi eficaz na eliminação de RNAdf nesses basidiomicetos. Segundo Ikeda *et al.* (2004), a técnica de eliminação de RNAdf através do mecanismo de reprodução sexual em *R. necatrix* é baseado no fato de que RNAdf é mais freqüentemente detectado em fungos obtidos de áreas cultivadas do que em fungos de áreas não cultivadas. A alta freqüência de RNAdf em áreas cultivadas sugere que a prática agrícola funciona como um mecanismo para inibir a reprodução sexual, desde que as plantas mortas sejam removidas das culturas.

A técnica de eliminação de RNAdf utilizando o mecanismo de reprodução sexual também foi utilizada com sucesso em ascomicetos fitopatogênicos como *Cryphonectria parasitica* (NUSS, 1992), *Ophiostoma ulmi* (ROGERS; BUCK, 1986), e *Gaeumannomyces graminis* (MCFADDEN; BUCK; RAWLINSON, 1983).

Diapeningen, Debets e Hoeskstra (2007) isolaram uma linhagem selvagem de *Aspergillus niger* com RNAdf que formou setores sem conídios e com taxa de crescimento reduzida. Observou-se que esse fenótipo anormal possui titulação de micovírus elevada quando comparada com o micélio adjacente da colônia, devido a intensidade das bandas de RNAdf. Esta foi a única linhagem que foi curada através de isolamento seqüencial de ponta de hifa de um total de 10 linhagens.

Romo *et al.* (2007), identificaram um vírus de RNAdf que infecta o endofítico *Epichlœ festucae* como pertencente à família Totiviridae. As tentativas feitas para curar linhagens infectadas por calor falharam, e o que se observou é que em temperaturas elevadas, a concentração do vírus aumenta nesta espécie. Segundo os autores, este fato sugere a destruição de mecanismos mantenedores da homeostase nas células.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS UTILIZADAS

Foram utilizadas neste trabalho diferentes linhagens dos fungos *Guignardia citricarpa* (PC3C, PC13/96, PC7LD6, PC7LE10, PCIAC 19/02, PC3G, 28/05 e 33/05) e *Guignardia mangiferae* (19/05), apresentadas no quadro 1. Estas linhagens pertencem à coleção de microrganismos do Laboratório de Genética de Microrganismos da UFPR (LabGeM).

ESPÉCIE	LINHAGEM	HOSPEDEIRO	ANO	ISOLAMENTO
<i>G. citricarpa</i>	PC3C	<i>Citrus</i> sp	-	África do Sul
<i>G. citricarpa</i>	PC13/96	<i>Citrus</i> sp	1996	Cordeirópolis/SP
<i>G. citricarpa</i>	PC7LD6	<i>Citrus</i> sp	1996	Mogi-Guaçu/SP
<i>G. citricarpa</i>	PC7LE10	<i>Citrus</i> sp	1996	Mogi-Guaçu/SP
<i>G. citricarpa</i>	PCIAC 19/02	<i>Citrus</i> sp (limão Eureka)	2002	Cordeirópolis/SP
<i>G. citricarpa</i>	PC3G	<i>Citrus sinensis</i> (laranja pêra)	2002	Jaboticabal/SP
<i>G. citricarpa</i>	28/05	<i>Citrus</i> sp	2005	Jaboticabal/SP
<i>G. citricarpa</i>	33/05	<i>Citrus</i> sp	2005	Jaboticabal/SP
<i>G. mangiferae</i>	19/05	<i>Citrus</i> sp	2005	Jaboticabal/SP

QUADRO 1 – HOSPEDEIRO, ANO E LOCAL DE ISOLAMENTO DAS LINHAGENS UTILIZADAS DE *Guignardia citricarpa* e *Guignardia mangiferae*
 FONTE: O autor (2008)

4.2 MEIOS DE CULTURA

4.2.1 Meio BDA– Batata-Dextrose-Ágar

Batata descascada e cortada	200 g
Dextrose	20 g
Água destilada	p/ 1.000 mL

A batata foi fervida em 500 mL de água destilada por 20 minutos, em seguida peneirada de forma a se obter apenas o caldo. A dextrose foi adicionada ao caldo resultante e o volume será completado para 1.000 mL com água destilada. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 0,1 M. Para meio BDA sólido, foi acrescentado 1,5% de ágar. O meio foi autoclavado e armazenado em temperatura ambiente.

4.2.2 Meio Citros FN (NISHIMURA, 2008, com modificações)

Folhas de citros	28g
Glicose	20g
Água destilada	p/ 1000 mL

As folhas de citros foram selecionadas e lavadas em água corrente. Em seguida, foram autoclavadas em um erlemayer de 1000mL, com 400 mL de água destilada por 20 minutos. A solução resultante foi filtrada e a glicose adicionada. O volume então foi completado para 1.000 mL com água destilada. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 0,1 M. Para meio citros sólido, foi acrescentado 1,5% de ágar. O meio foi autoclavado e armazenado em temperatura ambiente.

4.2.3 Meio Aveia

Aveia em flocos	30g
Água destilada	p/ 1000 mL

Ferveu-se a aveia em cerca de 300mL de água, por 20 minutos. Em seguida, a solução resultante foi filtrada com gaze, para eliminar os resíduos da aveia. Completou-se então o volume para 1000mL, com água destilada. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 0,1 M. Para meio aveia sólido, foi acrescentado 1,5% de ágar. O meio foi autoclavado e armazenado em temperatura ambiente.

4.3 SOLUÇÕES E REAGENTES

4.3.1 Solução Estoque de Tetraciclina

Tetraciclina	1,0 g
Etanol absoluto	20 mL

A solução foi preparada sob agitação e estocada em frasco escuro a -20°C .

4.3.2 *Taq* DNA polimerase

A enzima *Taq* DNA polimerase utilizada nas reações de amplificação é da marca Invitrogen, na concentração de 5U/uL.

4.3.3 Desoxirribonucleotídeos (dNTPs)

Os quatro desoxirribonucleotídeos (dAPT, dTTP, dGTP, dCTP) estoques (100mM), foram diluídos em água ultra pura a 2,5mM (solução de uso). Nas reações de amplificação, a concentração final utilizada foi de 0,2mM de cada dNTP.

4.3.4 Tampão de Extração de DNA (RAEDER; BRODA, 1985)

Tris-HCl pH 8,0	200 mM
NaCl	250 mM
EDTA	25 mM
SDS (p/v)	1%

A solução foi preparada e aquecida a 60°C no momento do uso.

4.3.5 Fenol

Os cristais de estoque de fenol são derretidos em banho-maria a 60°C até obtenção de uma fase líquida. Um volume é então transferido para um becker e a ele é adicionado 0,1% de 8-hidroxiquinolina que tornará a solução amarela e evitará a oxidação da mesma. Em seguida são realizados vários banhos com Tris-HCl pH 8,0, em que o volume utilizado deve ser o mesmo do Fenol. O primeiro banho é realizado com Tris-HCl 0,5 M e os outros com Tris-HCl 0,2 M. Ao final de cada lavagem deve se medir o pH do fenol com uma fita indicadora. Quando estiver superior a 7,6, é considerado equilibrado, e deve ser conservado a uma temperatura de 4°C por 48 horas antes do uso.

4.3.6 Clorofane

Fenol equilibrado e clorofórmio p.a. na proporção de 1:1.

4.3.7 Clorofil

Clorofórmio	24 volumes
Álcool Isoamílico	1 volume

4.3.8 Solução Tris-HCl 1 M pH 8,0 (solução estoque)

O pH desta solução será ajustado para 8,0 com HCl 5 mol/L. A solução será autoclavada e mantida a 4°C. Ocasionalmente o pH será ajustado para outros valores.

4.3.9 Solução EDTA 0,5 M pH 8,0 (solução estoque)

O pH desta solução será ajustado para 8,0 com pastilhas de NaOH 10 mol/L. A solução será autoclavada e mantida a 4°C.

4.3.10 Tampão TBE 5X (solução estoque)

Tris-base	54 g
Ácido Bórico	27,5 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	20 mL
H ₂ O destilada	p/ 1000 mL

A solução será autoclavada e mantida em temperatura ambiente. No momento do uso, será diluída convenientemente em água destilada.

4.3.11 Gel de Agarose (1,0%)

Agarose	1,0 g
Tampão TBE 1X	100 mL

4.3.12 Gel de Agarose (1,5%)

Agarose	1,5g
Tampão TBE 1x	100mL

4.3.13 Solução de Brometo de Etídio

O brometo de etídio será dissolvido (1,0% p/v) em água destilada. No momento do uso, serão adicionados 3 µl em 100 mL de água destilada. A solução será mantida em temperatura ambiente.

4.4 PREPARO DE MATERIAL

4.4.1 Esterilização

Meios de cultura, soluções e palitos de transferência foram esterilizados em autoclave, à pressão de 1 atmosfera por 20 minutos.

Vidrarias foram esterilizadas em forno Pasteur a 180 °C por 6 horas.

4.4.2 Incubação

Linhagens de *G. citricarpa* e *G. mangiferae* repicadas em placas com meio sólido foram incubadas em estufa tipo BOD, a 28° C ou 37° C, por tempo e luminosidade variados, conforme especificado nas metodologias.

4.5 ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

4.5.1 Isolamento de fungos endofíticos

A metodologia utilizada para o isolamento dos microrganismos endofíticos está descrita em Petrini (1991) com algumas modificações.

Foram realizadas três coletas, entre Setembro de 2007 e Setembro de 2008, em plantas de citros no município de Paranaíba-PR. O local das coletas está entre as coordenadas 23°00'01" ao Sul e 52°38'00" a Oeste, aproximadamente (GOOGLE, 2008).

Para a coleta do material foi realizada uma seleção aleatória das plantas adultas, e escolhidas tanto folhas de aspecto jovem quanto as de aspecto mais

maduro, todas folhas assintomáticas. O material foi devidamente identificado, acondicionado em sacos plásticos e mantido sob refrigeração por até 24 horas.

Para desinfestação da superfície do material vegetal, a fim de eliminar os microrganismos epifíticos, as folhas foram levemente esfregadas com auxílio de uma esponja e lavadas em água corrente. Os pecíolos foram parafinados para evitar a entrada da solução esterilizante nos tecidos internos das folhas e preservar os endofíticos a serem isolados. Em seguida, as folhas foram imersas em água destilada esterilizada por 1 minuto, etanol 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3% por 5 minutos, novamente lavadas em etanol 70% por 30 segundos, e finalizando em água destilada esterilizada por 6 minutos.

As folhas foram cortadas assepticamente em quatro fragmentos, e estes transferidos para placas de Petri contendo BDA (item 4.2.1) pH 5,8, adicionado de tetraciclina (100 µg/mL) (item 4.3.1), para evitar o crescimento de bactérias endofíticas.

Todas as placas foram incubadas a 25°C e verificadas diariamente quanto ao crescimento de fungos endofíticos. Os isolados obtidos foram transferidos para frascos com meio citros (item 4.2.2) pH 5,8, incubados a 28°C, e posteriormente estocados sob refrigeração a 4°C.

4.5.2 Identificação dos fungos endofíticos

Os fungos endofíticos foram identificados por meio de observação macroscópica da colônia e microscópica das estruturas de reprodução após 21 dias de crescimento em meio BDA (item 4.2.1), em diferentes condições de temperatura (temperatura ambiente, 28°C e 37°C), utilizando o corante lactofenol azul de algodão.

Os isolados que não esporularam neste período de crescimento não foram identificados neste trabalho.

A identificação ao nível de espécie, para *Guignardia citricarpa*, foi realizada por meio do teste de halo em meio aveia (item 4.5.2.1), e por *PCR multiplex* (item 4.5.2.2).

4.5.2.1 Teste do halo em meio aveia

Feltrin (2008) observou que o teste do halo em meio aveia é um marcador morfológico útil na identificação de *Guignardia citricarpa*, embora não seja seguro. O autor se baseou nos estudos de Baayen *et al.* (2002), que mostraram que as colônias de *G. citricarpa* e *G. mangiferae* apresentam crescimento divergente, e é possível evidenciar a presença de um halo de coloração amarelada ao redor das colônias de *G. citricarpa*. A presença do halo indica que o isolado pode pertencer à espécie *G. citricarpa*, enquanto a ausência do halo pode ser um indicativo para *G. mangiferae*.

Foi utilizado o teste do halo em meio aveia, conforme descrito por Feltrin (2008) e Baayen *et al.* (2002), para identificar ao nível de espécie o isolado de *Guignardia* spp. O isolado foi inoculado em meio aveia (item 4.2.3) e incubado em ausência de luz a 22°C. Após 7 dias procedeu-se a análise para verificar a presença ou ausência de halo ao redor das colônias.

4.5.2.2 Reação de PCR multiplex

Os trabalhos desenvolvidos por Fabris (2006) e Nishimura (2008), indicaram que o *PCR Multiplex* com os *primers* GCP1/GCP2 e GMF1/GMR2 é eficiente na identificação de *G. citricarpa* e *G. mangiferae*. Por essa razão, esta metodologia foi utilizada no presente trabalho.

Os pares de *primers* GCP1/GCP2 e GMF1/GMR2 foram utilizados em uma única reação, desta forma caracterizando uma *PCR multiplex*. Os *primers* GCP1 e GCP2, desenhados por Blanco (1999), amplificam um fragmento de 320 pb apenas em linhagens do fungo *G. citricarpa*. Os *primers* GMF1 e GMR2, desenhados por Kava-Cordeiro (2004), amplificam um fragmento de 750 pb em linhagens de *G. mangiferae*. Foram utilizadas duas linhagens com teste de patogenicidade como padrão de amplificação: 19/05 (*G. mangiferae*) e 28/05 (*G. citricarpa*).

A reação foi realizada de acordo com as condições otimizadas por Fabris (2006) e Nishimura (2008), contendo: 50 ng de DNA, tampão PCR 1x, 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (item 4.3.2), 0,5 mM de *primers*, 0,2 mM de cada dNTP (item 4.3.3),

1,5 mM de $MgCl_2$ e um volume final de 20 μ l. A amplificação seguiu uma desnaturação inicial a 94° C por 4 minutos; 35 ciclos de 1 min a 94° C, 1 minuto a 62° C, e 1 minuto a 72° C; e extensão final de 4 minutos a 72°C. O produto do *PCR multiplex* foi visualizado em gel de agarose 1,5% (item 4.3.12), utilizando o DNA *Ladder* 100 pb (INVITROGEN) como marcador de peso molecular.

4.6 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS

Para a extração de ácidos nucléicos totais das linhagens estudadas, foi utilizado o protocolo de Raeder; Broda, 1985, modificado por Glienke, 1995.

Foram feitos repiques de cada linhagem em 3 placas contendo meio citros (item 4.2.2) com papel celofane esterilizado, em vários pontos diferentes da placa. Em seguida o material foi incubado a 28°C por no máximo 5 dias. Após este período de crescimento, as colônias foram retiradas do meio com o auxílio de uma espátula esterilizada, cuidando para não deixar resíduo de meio de cultura. Os discos de micélio foram colocados em frascos fechados com filme de parafina, congelados e armazenados ou levados ao liofilizador (com o filme de parafina perfurado). Após a liofilização, os frascos foram fechados hermeticamente e armazenados em freezer ou procedeu-se a extração de ácidos nucléicos.

Para quebrar as paredes celulares e liberar o conteúdo intracelular, foi adicionado nitrogênio líquido aos micélios, e estes triturados em gral com um pistilo, até formar um pó fino. O pó resultante foi transferido para 4 tubos *eppendorf* (40 – 60 mg/tubo) e adicionado um volume de tampão de extração (item 4.3.4), preparado no momento do uso e aquecido em banho-maria a 70°C.

Os tubos *eppendorf* foram homogeneizados em vortex até a obtenção de uma solução homogênea e mantidos em banho-maria a 70°C, sem submersão por 20 – 30 minutos. Após esse período os passos seguintes do protocolo foram realizados na capela, devido à toxicidade dos reagentes.

Foi adicionado um volume de fenol equilibrado pH 8,0 (item 4.3.5) a cada um dos tubos, e centrifugados por 15 minutos a 5000 rpm. Em seguida, a fase sobrenadante foi coletada e transferida para outros tubos, aos quais foi acrescentado um volume de clorofane (item 4.3.6) e centrifugados nas mesmas condições. Repetiu-

se o procedimento com adição de um volume de clorofil (item 4.3.7) e centrifugação também por 15 minutos a 5000 rpm. A fase sobrenadante foi transferida para tubos novos, aos quais foram adicionados dois volumes de etanol absoluto. Esses tubos foram mantidos a -20 °C por no mínimo 1 hora, para a precipitação dos ácidos nucléicos. Os tubos foram centrifugados novamente por 20 minutos a 12000 rpm e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com etanol 70% (1 mL por tubo) e centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm.

O etanol foi descartado e os tubos foram deixados abertos a 37°C por 1 hora ou durante a noite em temperatura ambiente, para secagem. Os ácidos nucléicos foram ressuspensos com água Milli-Q esterilizada (geralmente 50µL).

4.7 ELETROFORESE

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1% (item 4.3.11) ou 1,5% (item 4.3.12), dependendo do objetivo, utilizando como tampão TBE 1X a 3 V/cm. Como marcadores de peso molecular foram utilizados o DNA de fago λ clivado com a enzima *HindIII* e o DNA *Ladder* 100 pb. O gel foi corado em solução de brometo de etídio (item 4.3.13). Devido a capacidade desse se intercalar aos ácidos nucléicos e ser fluorescente sob luz ultra-violeta, o gel pôde ser evidenciado em transiluminador e fotografado.

4.8 RNA DUPLA FITA

4.8.1 Detecção de RNA dupla fita

A detecção de bandas de RNA dupla fita em *Guignardia citricarpa* foi feita por meio de eletroforeses dos ácidos nucléicos totais em gel de agarose 1% (item 4.3.11). O peso molecular de cada banda foi determinada utilizando como padrão o DNA do fago λ clivado com a enzima *HindIII*.

4.8.2 Cura do RNA dupla fita

Para a cura do RNA do fungo *Guignardia citricarpa* foi utilizada a técnica de repiques sucessivos de ponta de hifa, após incubação por 21 dias em temperatura moderadamente elevada para este gênero (37°C) (MARTINS, 2005; MONTENEGRO, 2007; SILVA, 2008). Para cada isolado devem ser realizados repiques em meio citros (item 4.2.2). As placas de Petri devem ficar em estufa à 37°C por 21 dias, e a partir das colônias que se desenvolverem, deverá ser realizado mais um repique para obter a 2ª geração à 37°C. Após 21 dias, deve ser realizado o 3º repique, porém, neste, as placas devem ser incubadas em estufa à 28°C para obter material para a extração de DNA.

Todos os repiques devem ser feitos com auxílio de lupa para a secção das pontas das hifas crescidas nos meios de cultura (repiques de pontas de hifas).

Extrações de ácidos nucléicos totais devem ser feitas para verificar se houve a cura RNA dupla fita.

4.8.3 Confirmação da cura do RNA dupla fita

Para confirmar se realmente houve a cura do RNA dupla fita, linhagens consideradas curadas foram submetidas a novas extrações de ácidos nucléicos totais e a novas eletroforeses, vários meses após o tratamento para cura.

4.8.4 Teste de compatibilidade vegetativa

Duas linhagens, uma com e outra sem RNAdf, foram inoculadas no centro de uma placa de Petri com meio citros (item 4.2.2), a uma distância de dois centímetros entre os inóculos. Após o crescimento por 7 dias a 28°C, a morfologia das colônias foi observada macroscopicamente e microscopicamente por meio de microscopia óptica, para averiguar a compatibilidade entre as linhagens avaliados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

5.1.1 Isolamento de fungos endofíticos

Nos isolamentos de fungos endofíticos realizados neste trabalho, o isolado mais frequente pertence ao gênero *Colletotrichum*. Dos vários isolados obtidos, apenas um foi identificado como representante do gênero *Guignardia*, considerando as características morfológicas. Como o objetivo dos isolamentos era obter isolados de *G. citricarpa* da região de Paranavaí, procedeu-se a identificação ao nível de espécie para este isolado, nomeado como ECLaP.

5.1.2 Identificação dos fungos

5.1.2.1 Teste do halo em meio aveia

No teste com o marcador morfológico que utiliza o teste do halo em meio aveia, o isolado ECLaP de *Guignardia* spp apresentou formação de halo amarelado após 7 dias (FIGURA 01), indicando que a espécie é *G. citricarpa*.

Em seu trabalho, Feltrin (2008) utilizou como controle para *G. citricarpa* a linhagem 33/05, pois esta possui teste de patogenicidade, como descrito em Baldassari (2005). Esta linhagem formou halo amarelado em todos os testes. A formação do halo em meio aveia não é um teste totalmente seguro, pela possibilidade deste marcador morfológico apresentar falsos negativos (MURAI, 2007). Em Feltrin (2008), das 174 linhagens testadas, identificadas como *G. citricarpa*, 169 formaram halo. Desta forma, 5 delas não apresentaram halo, apesar

de terem sido identificadas como *G. citricarpa* pelo método do *PCR multiplex*, realizado por Nishimura (2008).

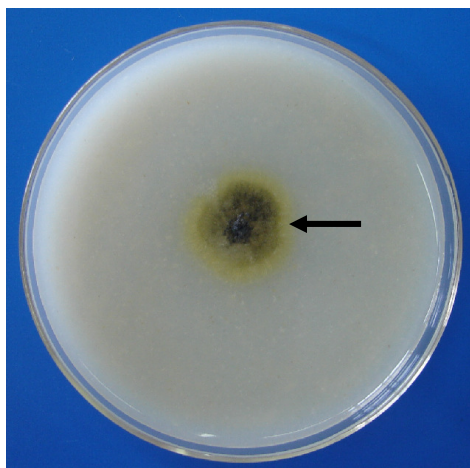


FIGURA 01 – MORFOLOGIA DO ISOLADO ECLaP (*Guignardia* spp) EM MEIO AVEIA APÓS 7 DIAS
FONTE: O autor (2008)

NOTA: Seta = Halo amarelado ao redor da colônia de *Guignardia* spp

5.1.2.2 Reação de *PCR multiplex*

A eletroforese do produto da reação de *PCR multiplex* com os *primers* GCP1/GCP2 e GMF1/GMR2 (FIGURA 02) revelou a presença de uma banda de aproximadamente 300pb no isolado ECLaP de *Guignardia* spp testado. Esta banda mostra que houve amplificação com os *primers* GCP1 e GCP2, e portanto, o isolado é mesmo pertencente à espécie de *G. citricarpa*, confirmando o resultado do teste do halo em meio aveia.

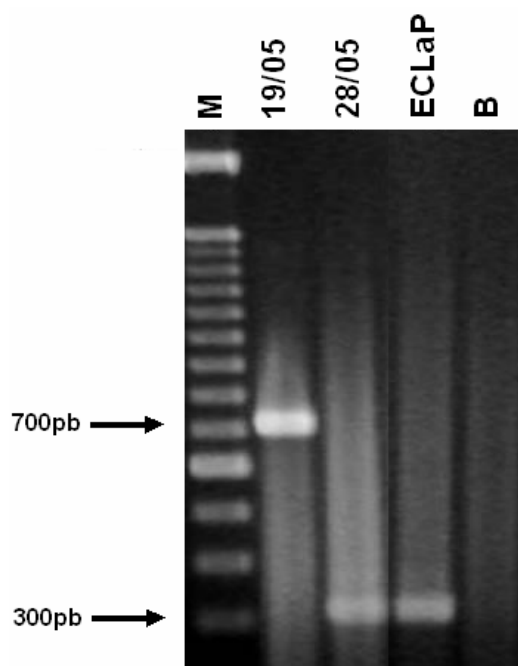


FIGURA 02 – PRODUTOS DA REAÇÃO DE *PCR multiplex* DO ISOLADO ECLaP (*Guignardia* spp) COM OS *primers* GCP1/GCP2 e GMF1/GMR2

FONTE: O autor (2008)

NOTAS: M = Marcador de peso molecular DNA *Ladder* 100pb. 19/05 (*G. mangiferae*) e 28/05 (*G. citricarpa*): linhagens com teste de patogenicidade utilizadas como padrão de amplificação. B = tubo branco.

Com estes resultados, é possível afirmar que a espécie *G. citricarpa* pode estar presente nos pomares da região de Paranavaí. Até o momento, existem muitas controvérsias a respeito da ocorrência da MPC nesta região. Koyashiki (2006) relatou que a doença foi descoberta em agosto de 2005, em Paranavaí.

No momento da coleta do material para o isolamento, as folhas de citros não apresentavam sintomas de MPC. Desta forma, o isolado ECLaP estava na forma endofítica. A maior preocupação está na possibilidade do fungo evoluir para a MPC, a partir dessa forma assintomática.

5.2 RNA DUPLA FITA

5.2.1 Detecção do RNA dupla fita

Os ácidos nucléicos totais do isolado ECLaP obtidos em uma primeira extração, 2 meses após o isolamento, foram submetidos a uma eletroforese (FIGURA 03 A). Nesta, foi observado uma banda extra, que apresenta aproximadamente 3100 pares de base (pb), com base no marcador de peso molecular DNA de fago lambda clivado com *Hind* III.

Em estudos anteriores (KAVA-CORDEIRO, 2007; MONTENEGRO, 2007; SILVA, 2008) outras linhagens de *G. citricarpa* apresentaram esta banda extra com aproximadamente 3100pb, e sugeriu-se que fosse uma banda de RNA dupla fita (RNAdf). Silva (2008) procedeu com tratamentos enzimáticos, com Nuclease S1, com DNase e com RNase, para confirmar essa hipótese. No tratamento com a enzima Nuclease S1, que cliva ácidos nucléicos de fita simples, a banda extra continuou presente. Quando os ácidos nucléicos foram tratados com DNase, enzima que cliva DNA, a banda de DNA genômico desapareceu, restando apenas a banda extra. Por fim, no tratamento com RNase, enzima que cliva todos os tipos de RNA (inclusive os de dupla fita), a banda extra não foi observada, apenas a banda de DNA genômico. Assim, Silva (2008) confirmou a hipótese de que as bandas extras apresentadas pelas linhagens referem-se realmente a RNAdf.

Desta forma, a banda extra encontrada no isolado ECLaP também foi considerada como uma banda de RNAdf, por ser muito semelhante à banda de RNAdf encontrada nas linhagens de *G. citricarpa* investigadas por Silva (2008).

Para avaliar a estabilidade da infecção por moléculas de RNAdf em ECLaP, uma nova extração de ácidos nucléicos totais foi realizada, 8 meses após o isolamento. Na eletroforese destes produtos (FIGURA 03 B) a banda extra, considerada como de RNAdf, não pôde ser observada. Acredita-se que o não aparecimento dessa banda é resultado de uma baixa titulação de moléculas de RNAdf. Essa baixa titulação não é revelada por meio de eletroforese, e pode ter ocorrido devido às condições de laboratório, pois todos os meses são feitos vários repiques para estoque do isolado. Mas, não se pode descartar a possibilidade de ter

ocorrido a total eliminação das moléculas de RNAdf. Assim, sugere-se que novas extrações do isolado ECLaP sejam feitas para confirmar se houve eliminação, ou uma baixa titulação de moléculas de RNAdf.

Frente a estes resultados, percebe-se a importância de se repetir as extrações de ácidos nucleicos totais, ao menos duas vezes ao ano, a fim de verificar a estabilidade da infecção por RNAdf naquelas linhagens em que essas moléculas foram detectadas.

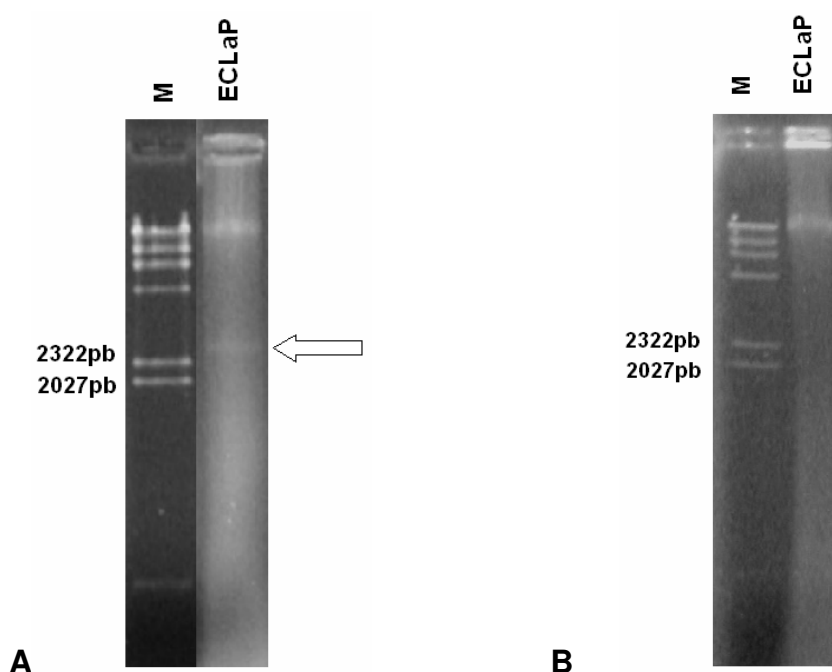


FIGURA 03 – ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS DO ISOLADO ECLaP DA ESPÉCIE *G. citricarpa*, PARA A DETECÇÃO DE RNAdf

FONTE: O autor (2008)

NOTAS: M = Marcador de peso molecular DNA de fago lambda clivado com *Hind* III. Seta = banda extra (de RNAdf). (A) Extração de ácidos nucleicos totais 2 meses após o isolamento. (B) Extração de ácidos nucleicos totais 8 meses após o isolamento.

5.2.2 Cura do RNA dupla fita

Como havia sido detectada a presença de RNA dupla fita (RNAdf) no isolado ECLaP, procedeu-se o tratamento de cura por repiques sucessivos de ponta de hifa, após incubação por 21 dias a 37°C, para tentar eliminar o RNAdf. A escolha deste protocolo baseou-se nos resultados obtidos por Montenegro (2007) e Silva (2008), que conseguiram a cura em linhagens de *Phyllosticta spinarum* e *G. citricarpa*, usando o tratamento descrito.

Nas primeiras tentativas, após o período de 21 dias a 37°C, não houve crescimento das colônias, indicando que o processo inibe o crescimento deste isolado.

Para tentar otimizar o protocolo de cura por repiques sucessivos de ponta de hifa, após incubação por 21 dias em temperatura levada, a temperatura de incubação foi alterada para 35°C. Após os 21 dias de incubação da primeira geração, houve um crescimento muito pequeno que não permitia o repique de pontas de hifa. Então, as placas com essas colônias tratadas foram incubadas por 2 dias a 28°C, na tentativa de obter hifas que pudessem ser repicadas. Desta vez, houve um crescimento significativo, e pôde ser efetuado o repique de pontas de hifa, passando para a segunda geração, que foi novamente incubada a 35°C.

Até o momento, o experimento ainda está em andamento, na segunda geração. Sugere-se a continuidade do experimento, e que seja testado um maior número de gerações sob as condições de estresse, para a efetiva eliminação de RNAdf. No final, deve-se extrair os ácidos nucléicos das colônias tratadas, e verificar se houve a eliminação de RNAdf por meio de eletroforeses. Caso não aparecer a banda extra correspondente ao RNAdf, o isolado pode ser considerado possivelmente curado. A confirmação da cura deve ser efetuada meses depois, para avaliar se não está ocorrendo flutuações na titulação de moléculas de RNAdf, simulando uma aparente cura. Por fim, se for confirmado a cura, deverá ser feito uma reação de amplificação com oligonucleotídeos iniciadores aleatórios, do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), a fim de evidenciar a identidade genética das colônias curadas com as colônias originais do mesmo isolado (isogenia). Se houver isogenia, testes podem ser feitos para avaliar a influência do RNAdf em *G. citricarpa*.

No entanto, durante o andamento deste experimento, verificou-se que colônias do isolado ECLaP que não foram submetidas aos tratamentos de cura induzida não apresentaram a banda de RNAdf, 8 meses após o isolamento (FIGURA 03 B). Com isso, sugere-se que novas extrações do isolado ECLaP sejam feitas para averiguar o que acarretou na ausência da banda extra. Se for confirmado que ocorreu eliminação do RNAdf, todo o trabalho de cura por repiques sucessivos de ponta de hifa e incubação em temperatura elevada deverá ser desconsiderado, já que o objetivo da cura é obter colônias curadas com mesma identidade genética que as colônias originais (com RNAdf), para então proceder a análise da influência das moléculas de RNAdf em *G. citricarpa*. Se o isolado ECLaP não estiver mais infectado por RNAdf, não haverá colônia isogênica com RNAdf, impedindo comparações.

Portanto, até o momento, a realização deste experimento contribuiu para a otimização do protocolo de cura para diferentes isolados de *G. citricarpa*.

5.2.3 Confirmação da cura do RNA dupla fita

Durante seu trabalho, Silva (2008) conseguiu obter colônias de linhagens de *G. citricarpa* que não apresentaram bandas de RNAdf após o tratamento de cura por meio de exposição à temperatura moderadamente elevada (37°C), e repique em ponta de hifa (FIGURA 04). Por essa razão, a autora considerou essas colônias como curadas. Por meio de RAPD, constatou a isogenia entre as colônias curadas e as originais, e se prosseguiu com testes para avaliar a influência do RNAdf em *G. citricarpa*. Silva (2008) observou que algumas colônias curadas apresentaram um menor crescimento radial e uma menor taxa de produção de esporos quando comparados com a colônia original contendo RNAdf, e sugeriu que as moléculas de RNAdf presentes nesta linhagem de *G. citricarpa* estudada possam estar contribuindo para o aumento da produção de esporos e crescimento do fungo, e desta forma poderiam estar atuando na hipervirulência desta linhagem. No entanto, a autora também verificou que a interferência causada pelo RNAdf variou muito entre as linhagens analisadas.

Diante dos resultados de Silva (2008), buscou-se no presente trabalho, confirmar a eliminação do RNAdf nas colônias consideradas curadas. A hipótese inicial era de que algumas colônias podem não ter sido totalmente curadas, restando ainda uma quantidade de moléculas de RNAdf responsável pela variação observada nos resultados da interferência.

Para confirmar a cura, as colônias consideradas curadas foram novamente examinadas quanto à presença de RNAdf, com novas extrações de ácidos nucleicos totais, vários meses após o tratamento para cura. As eletroforeses dos produtos destas novas extrações revelaram bandas extras características de RNAdf em três colônias que foram consideradas curadas (33/05 C, PC3C C e PC7LE10 C), como pode ser observado na figura 05.

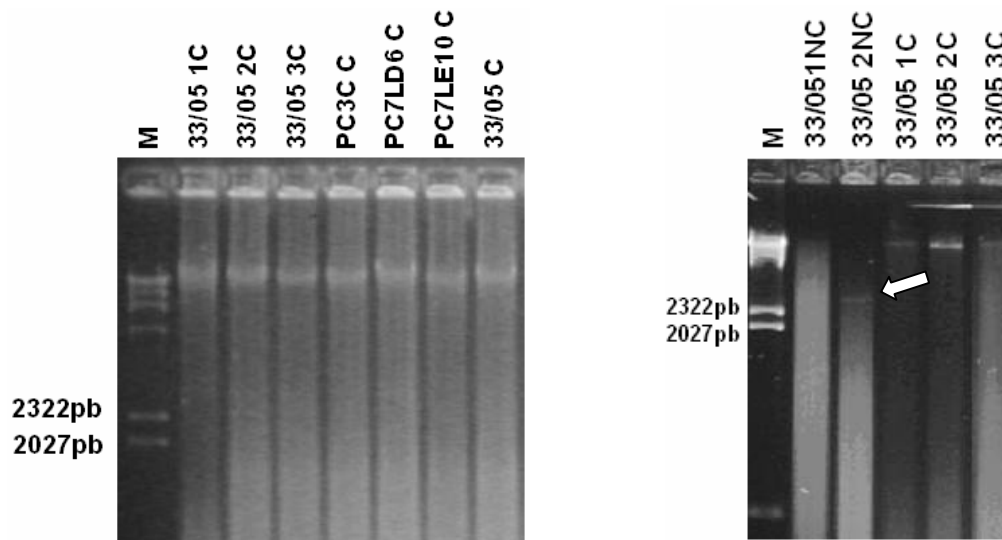


FIGURA 04: ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS DAS COLÔNIAS DE LINHAGENS DE *G. citricarpa* APÓS TRATAMENTO PARA CURA DO RNAdf

FONTE: Silva (2008)

NOTAS: M: Marcador de peso molecular DNA de fago lambda clivado com *Hind* III. 33/05 1C, 2C e 3C: Colônias curadas da linhagem 33/05. 33/05 1NC e 2NC: colônias tratadas não curadas da linhagem 33/05. 33/05 C, PC3C C, PC7LE10 C e PC7LD6 C: colônias curadas das linhagens 33/05, PC3C, PC7LE10 e PC7LD6, respectivamente. Seta: Banda de RNAdf.

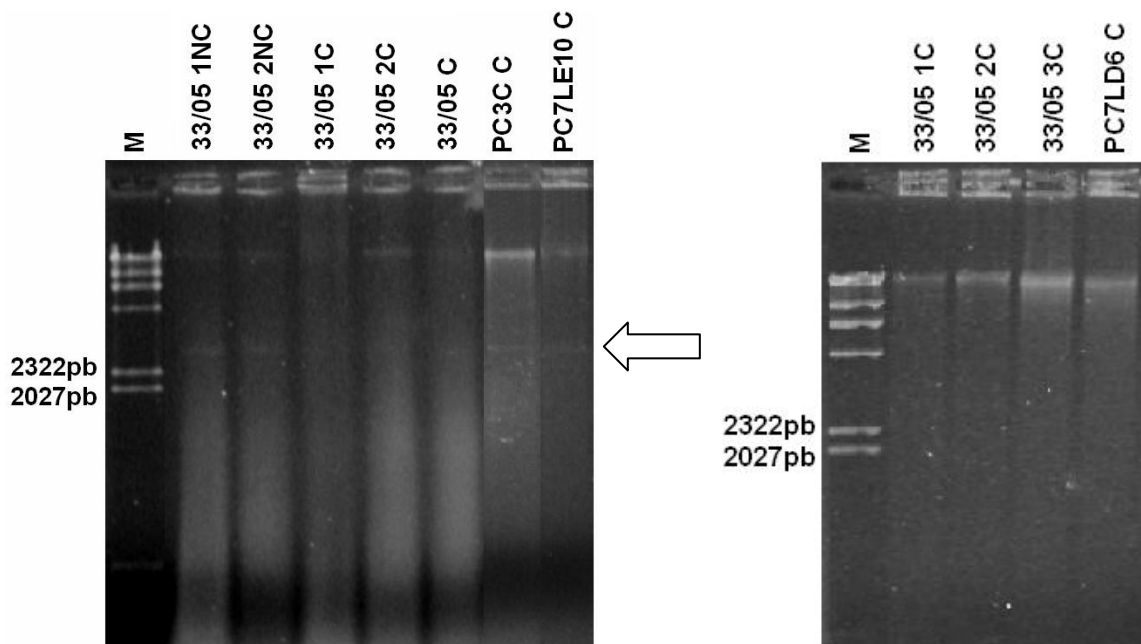


FIGURA 05 - ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS DAS COLÔNIAS CURADAS DE LINHAGENS DE *G. citricarpa* APÓS VÁRIOS MESES

FONTE: O autor (2008)

NOTAS: M: Marcador de peso molecular DNA de fago lambda clivado com *Hind* III. 33/05 1C, 2C e 3C: Colônias curadas da linhagem 33/05. 33/05 1NC e 2NC: colônias tratadas não curadas da linhagem 33/05. 33/05 C, PC3C C, PC7LE10 C e PC7LD6 C: colônias curadas das linhagens 33/05, PC3C, PC7LE10 e PC7LD6, respectivamente. Seta: Banda de RNAdf.

Estes resultados mostram que o protocolo de cura por meio de exposição à temperatura moderadamente elevada (37°C), e repique em ponta de hifa não foi eficiente na total eliminação das moléculas de RNAdf, nas linhagens de *G. citricarpa* estudadas. A titulação de moléculas de RNAdf parece diminuir durante o tratamento para cura, e por essa razão, a pequena quantidade de RNAdf não é detectada em eletroforese. Mas, após alguns meses, ocorre um aumento significativo no número das moléculas virais tornando novamente possível a visualização da banda de RNAdf em eletroforese. Sugere-se novos tratamentos de cura, com adaptações no protocolo, para a otimização do processo de cura. Entre as adaptações que devem ser feitas, estão: aumentar o número de gerações expostas ao tratamento, pois assim, a chance de isolar uma subcultura sem RNAdf será maior; e alterar a temperatura para 35°C, para que o crescimento do fungo não seja inibido.

Park *et al.* (2006) obteve resultados muito interessantes utilizando tratamentos com temperaturas altas (de 35 a 37°C) na tentativa de eliminar o RNAdf de 2,8 kb da linhagem BK18 do fungo *Chalara elegans*. Tanto em eletroforese de gel de agarose, quanto em hibridização *Northern blot*, o fragmento de 2,8 kb de RNAdf não foi observado e a linhagem foi referida como BK18C, potencialmente curada. Para confirmar a cura, o autor realizou uma RT-PCR (“Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction”) usando um *primer* específico para o fragmento de RNAdf, com as linhagens BK18C, BK18 (com RNAdf) e AK208, linhagem selvagem sem RNAdf. Os resultados da RT-PCR mostraram uma banda em BK18C e AK208 com tamanho idêntico ao da linhagem infectada (BK18). Em virtude deste resultado, Park *et al.* (2006) sugeriu que possa existir uma infecção latente do fragmento 2,8 kb de RNAdf nas linhagens BK18C e AK208. Segundo ele, em alguns casos, a presença de infecção latente de certos vírus só é detectada por RT-PCR. Deng *et al.* (2003) também não conseguiu detectar o vírus de RNAdf OnuMV3a por eletroforese de gel de agarose ou hibridização *Northern blot* em *Sclerotinia homeocarpa*. Lakshman e Tsvantzis (1994) obtiveram resultados semelhantes com o fungo *Rhizoctonia solani*.

Analisando os resultados deste trabalho, e os resultados descritos em Park *et al.* (2006), Deng *et al.* (2003) e Lakshman e Tsvantzis (1994), sugere-se que a eletroforese em gel de agarose 1% pode não ser um método eficiente para detectar a presença de RNAdf, sendo necessário a utilização de outras técnicas mais

precisas, como um RT-PCR com oligonucleotídeos iniciadores especialmente desenhados, para confirmar a presença ou ausência das partículas virais, mesmo em baixas titulações. Porém, para obter esses oligonucleotídeos iniciadores, é preciso antes fazer um seqüenciamento do fragmento de RNAdf encontrado nas diferentes linhagens de *G. citricarpa*.

Convém ressaltar que, se a eletroforese em gel de agarose 1% não for um método eficiente para detectar a presença de RNAdf, é possível que outras linhagens de *G. citricarpa*, até o momento consideradas livres de RNAdf, podem ser infectadas com essas moléculas. No trabalho de Park *et al.* (2006), a linhagem AK208 do fungo *Chalara elegans*, era considerada como livre de RNAdf, mas nos resultados da RT-PCR, essa mesma linhagem apresentou uma banda com tamanho idêntico ao da linhagem infectada (BK18). Com isso, sugere-se que, se o RT-PCR for desenvolvido, sejam feitas novas análises, a fim de confirmar essa hipótese, e evitar problemas em outros estudos sobre RNAdf, como estudos de transmissão horizontal dessa moléculas.

5.2.4 Teste de compatibilidade vegetativa

O teste de compatibilidade vegetativa foi feito com o objetivo de avaliar metodologias para detectar linhagens compatíveis de *G. citricarpa*, para identificar possível transferência horizontal do RNAdf.

A relevância do teste de compatibilidade vegetativa é bem ilustrada nos estudos de Deng *et al.* (2002). Os autores testaram a transmissão de RNAdf entre linhagens infectadas e não infectadas de *Sclerotinia homoeocarpa*, e observaram que nos testes entre linhagens compatíveis, a transmissão foi de 100%, enquanto que nos testes com linhagens não compatíveis, a transmissão foi bem menor: 4,8% entre linhagens que formam um *gap* entre elas, e 36% entre linhagens que formam uma *line gap*. Com estes resultados, os autores concluíram que a incompatibilidade vegetativa pode reduzir a frequência de transmissão de RNAdf de linhagens infectadas para linhagens não infectadas. Anagnostakis e Day (1979) obtiveram 100% de transmissão de hipovírus entre linhagens compatíveis do fungo *Endothia*

parasitica. Cortesi *et al.* (2001) obtiveram resultados semelhantes, mas para o fungo *Cryphonectria parasitica*.

Os estudos de transmissão horizontal de RNAdf serão importantes para o desenvolvimento de um possível controle biológico para a MPC, desde que seja provado que o RNAdf causa hipovirulência em *G. citricarpa*. Azevedo *et al.* (2002) ressaltam a necessidade de diminuição do uso de agroquímicos, em especial os que causam danos ao meio ambiente, às comunidades microbiológicas e ao homem, desta forma, valorizando estratégias de controle biológico de pragas e doenças de inúmeras espécies cultivadas.

Em outros fungos fitopatogênicos o controle biológico baseado na transmissão de hipovirulência tem sido alvo de muitos estudos, como no fungo *Cryphonectria parasitica*, agente causador do cancro em castanheiras. Na Europa, esta doença vem sendo controlada pela disseminação de linhagens hipovirulentas (com vírus) e atualmente, lesões de cancro curadas estão sendo encontradas e investigadas. Em todas é confirmada a presença do RNA dupla fita do hipovírus (ROBIN; HEINIGER, 2001). Recentemente, Hoegger *et al.* (2003) comprovaram a disseminação dos vírus presentes nas linhagens infectadas em cancros previamente tratados com o fungo infectado com o vírus e também em novas lesões da doença, que não tinham sido tratadas anteriormente.

Neste trabalho, foram feitos testes preliminares de compatibilidade vegetativa entre linhagens de *G. citricarpa* portadoras do RNAdf e linhagens não infectadas. Foram feitos repiques pareados das linhagens ECLaP, 33/05 e PCIAC 19/02, todas com RNAdf, com as linhagens não infectadas PC13/96 e PC3G, nas diferentes combinações possíveis. As linhagens foram repicadas em placa de Petri a uma distância de aproximadamente 2 cm entre elas, incubadas a 28°C e verificadas após 7 dias de crescimento. Foi observado que, a essa distância, as colônias demoram mais para se encontrar, e por esse motivo, novos testes foram feitos, utilizando então 1cm de distância entre os inóculos. Desta vez, o experimento foi padronizado com placas de 9 cm de diâmetro e 30mL de meio citros. Para facilitar os estudos, uma membrana de celofane foi adicionada às placas com o meio de cultura, e os repiques foram feitos sobre essa membrana. Após 4 dias, foram feitas lâminas da área de contato entre as colônias, para verificar a compatibilidade dos micélios (FIGURA 06). Também buscou-se verificar a fusão de hifas (anastomose), pois a anastomose é essencial para a transmissão do RNAdf entre as linhagens.

Todas as combinações de linhagens infectadas com linhagens não infectadas mostraram-se compatíveis. No entanto, observou-se que, após 4 dias de crescimento, é muito difícil observar a anastomose, devido ao acentuado grau de desenvolvimento do micélio. Então, sugere-se que em novos testes a constatação da anastomose seja realizada com menos tempo de crescimento.

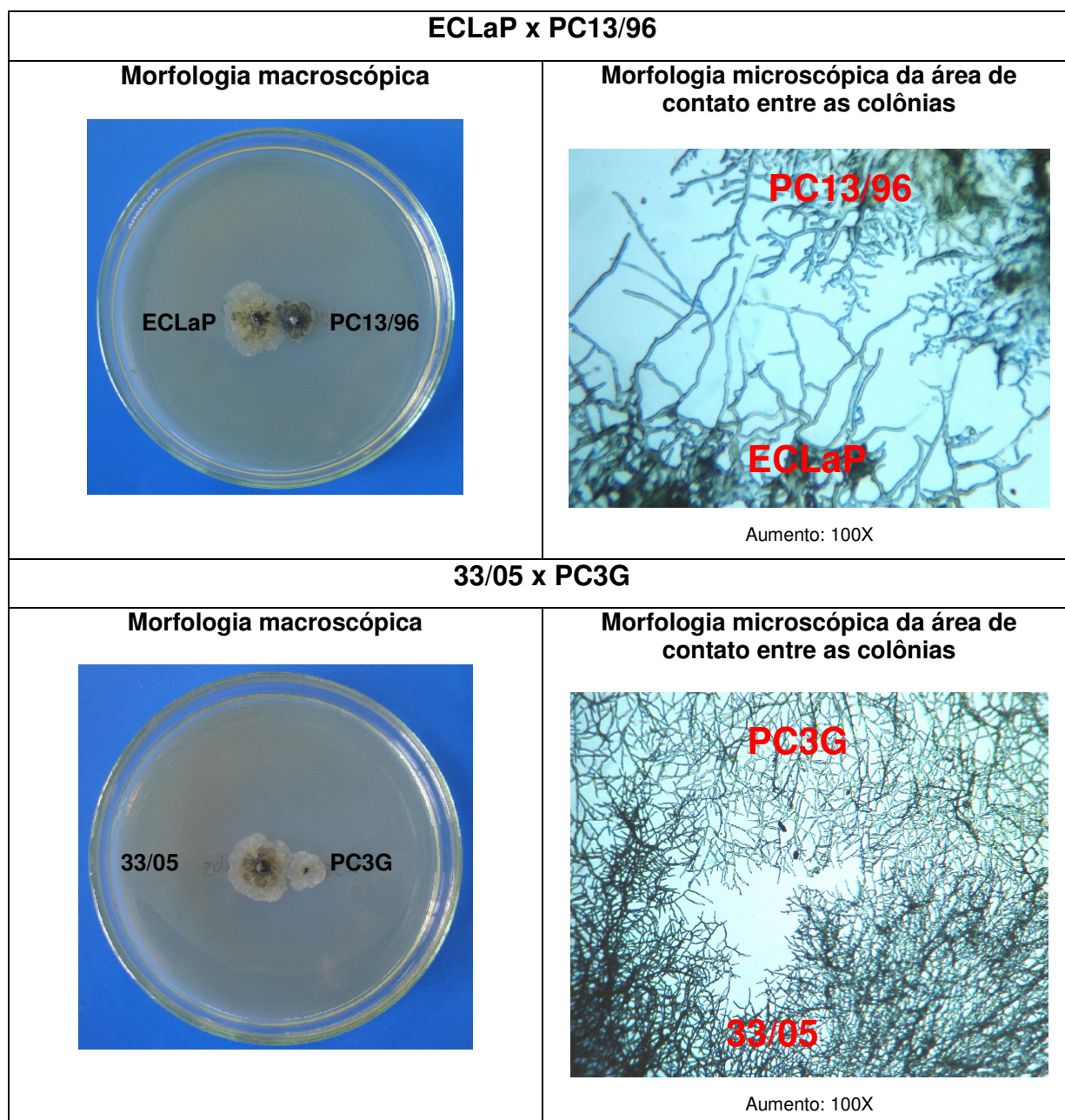


FIGURA 06- COMPATIBILIDADE ENTRE LINHAGENS DE *G. citricarpa* APÓS 4 DIAS DE CRESCIMENTO EM MEMBRANA DE CELOFANE SOBRE MEIO CITROS

FONTE: O autor (2008)

NOTA: ECLaP e 33/05 – linhagens de *G. citricarpa* com RNAdf. PC13/96 e PC3G – linhagens de *G. citricarpa* sem RNAdf.

Como o objetivo principal do teste de compatibilidade vegetativa é contribuir para o desenvolvimento de um controle biológico da MPC, sugere-se que sejam feitos novos testes, atentando para o local de isolamento das linhagens. Assim, será mais fácil aplicar os resultados em campo, em testes *in vivo*.

Antes de proceder a análise de transmissão horizontal de RNAdf nas linhagens compatíveis de *G. citricarpa*, é preciso identificar marcadores morfológicos entre elas. Desta forma, será possível observar se após o encontro entre colônias, a colônia da linhagem não infectada adquiriu as características da linhagem infectada por RNAdf, evidenciando sucesso na transmissão. A maioria dos marcadores morfológicos utilizados nos estudos de transmissão de RNAdf refere-se aos aspectos macro-morfológicos das colônias, principalmente pigmentação do micélio, como pode ser constatado nos trabalhos de Ding *et al.* (2007) e Papazova-Anakieva *et al.* (2008), para o fungo *C. parasítica*. Estes autores consideram a transmissão de hipovírus um sucesso quando a linhagem não infectada adquire coloração esbranquiçada, pois nesse fungo, as colônias das linhagens infectadas com RNAdf são brancas, enquanto as linhagens sem RNAdf são alaranjadas. Porém, dificilmente há variações morfológicas facilmente detectáveis entre linhagens de *G. citricarpa*, e sendo assim, sugere-se a realização de reações de RAPD, com diferentes *primers*, para tentar encontrar marcadores capazes de diferenciar as linhagens.

6 CONCLUSÕES

- Um isolado fúngico de plantas cítricas da região de Paranavaí, nomeado como ECLaP, foi identificado como *Guignardia citricarpa* por meio do teste do halo em meio aveia e pela reação de *PCR multiplex*.
- O isolado ECLaP apresentou uma banda extra semelhante à RNAdf descrita anteriormente que após 6 meses, em uma nova extração, não foi mais visualizada.
- Foi observado a importância de se repetir as extrações de ácidos nucleicos totais, ao menos duas vezes ao ano, a fim de verificar a estabilidade da infecção por RNAdf nas linhagens em que essas moléculas foram detectadas.
- O cultivo de colônias a partir de ponta de hifa a 37°C, na tentativa de eliminar RNAdf do novo isolado ECLaP, inibe o crescimento do fungo. Por esse motivo, estão sendo feitos alguns ajustes ao protocolo.
- O protocolo de cura utilizado por Silva (2008) não foi eficiente pois foi possível detectar RNAdf em linhagens consideradas curadas.
- A eletroforese em gel de agarose 1% para detectar a presença de RNAdf pode não ser um método eficiente, sendo necessário a utilização de outras técnicas mais precisas para confirmar a presença ou ausência das partículas virais.
- Pela proximidade de crescimento de micélio entre diferentes isolados de *G. citricarpa* deve haver compatibilidade entre elas, porém, o protocolo deve ser aprimorado para permitir a visualização da anastomose de hifas.

REFERÊNCIAS

ADLER-MOORE, J. Subcellular particles in pathogenic fungi. In HOWARD, D. H.; HOWARD, L. F. Fungi pathogenic for humans and animals, part B. **Pathogenicity and detection**. New York, Marcel Dekker, p. 103–121, 1985.

AHN, I.P.; LEE, Y.H. A viral double-stranded RNA up regulates the fungal virulence of *Nectria radicicola*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 14, p. 496-507, april, 2001.

ANAGNOSTAKIS, S. L.; DAY, P. R. Hypovirulence conversion in *Endothia parasitica*. **Phytopathology**, v69, p.1226–1229, 1979.

AZEVEDO, A.C.S.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; FARIA, M.R.; FUNGARO, M.H.P. Effects of double-stranded RNA on virulence of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the silverleaf whitefly, *Bemisia tabaci* strain B (homóptera: Aleyrodidae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, p. 61-63, 2000.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos Endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Editora EMBRAPA, Jaguariúna-SP. p. 117-137, 1998.

BAAYEN, R.P.; BONANTS, P.J.M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G.C.; VAN DER AA, H.A.; DE WEERDT, M.; VAN BROUWERSHAVEN, I.R.; SCHUTTE, G.C.; MACCHERONI JR., W.; GLIENKE DE BLANCO, C.; AZEVEDO, J.L. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*), **Phytopathology**, St. Paul, v.92, n. 5, p. 464-477, 2002.

BALDASSARI, R. B. Mancha Preta: uma realidade na citricultura. **Ciência e Prática**, nº22, 2006.

BALDASSARI, R. B. **Patogenicidade, morfologia de colônias e diversidade de isolados de *Guignardia citricarpa* e *G. mangiferae* obtidos de *Citrus* spp.** Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, 2005.

BALDASSARI, R. B.; GOES, A.; SANTOS, J. M.; TIMOSSI, A. J. Microscopia eletrônica de varredura de isolados de *Guignardia citricarpa* obtidos de plantas

cítricas. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 88-92, 2001.

BELL, A. A.; WHEELER, M.H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.24, p. 411-451, 1986.

BELL, C.R.; DICKIE, G.A.; HARVEY, W.L.G.; CHAN, J. Endophytic bacteria in grapevine. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, n.1, p.46-53, 1995b.

BLANCO, C.G. **Guignardia citricarpa Kiely: Análise Genética, Cariotípica e Interação com o Hospedeiro**. Tese (doutorado), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, Piracicaba, 1999.

BOLAND, G.J. Hypovirulence and double-stranded RNA in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 14, p. 10-17, 1992.

BOTTACIN, A. M.; LEVESQUE, C. A. ; PUNJA, Z. K. Characterization of dsRNA in *Chalara elegans* and effects on growth and virulence. **Phytopathology**, v84, p.303-312. 1994.

BOURETT, T.M.; HOWARD, R.J. *In vitro* development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 68, p. 329-342, 1990.

BUCK, K.W. Fungal virology – An overview. In: **Fungal virology**. Ed. K.W. Buck, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, p. 1-84, 1986.

CARROLL, G.C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualística symbiont. **Ecology**, Brooklym, v.69, p.2-9, 1988.

CASTRO, M.; KRAMER, K.; VALDIVIA, L.; ORTIZ, S.; BENAVENTE, J.; CASTILLO, A. A new double-stranded RNA mycovirus from *Botrytis cinerea*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 175, p. 95-99, 1999.

CHRISTO, D. **Variabilidade genética e diferenciação molecular de isolados endofíticos e patogênicos de *Guignardia* spp e *Phyllosticta* sp.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

CHU, Y.M.; JEON, J.J.; YEA, S.J.; KIM, Y.H.; YUN, S.H. LEE, Y.W.; KIM, K.H. Double-stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*. **Applied and**

Environmental Microbiology, Washington, v. 68, p. 2529-2534, 2002.

CHU, Y.M.; LIM, W. S; YEA, S.J.; CHO, J. D.; LEE, Y.W.; KIM, Y.H. Complexity of dsRNA Mycovirus Isolated from *Fusarium graminearum*. **Virus genes**, Netherlands, v. 28 n. 1, p. 135–143, 2004.

CLAY, K. Fungi and the food of the goods. **Nature**, v. 427, p. 401-402, 2004.

CORTESI, P., MCCULLOCH, C. E., SONG, H., LIN, H., & MILGROOM, M. G. Genetic control of horizontal virus transmission in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. **Genetics**, v159, p.107–118, 2001.

DALZOTO, P.R. GLIENKE-BLANCO, C., KAVA-CORDEIRO, V., RIBEIRO, J. Z., KITAJIMA, E. W., AZEVEDO, J. L. Horizontal transfer and hypovirulence associated with double-stranded RNA in *Beauveria bassiana*. **Mycological Research**. United Kingdom, v. 110, p. 1475-1481, 2006.

DARBYSHIRE, J.F.; GREAVES, M.P. The invasion of pea roots *Pisum sativum* L. by soil microorganisms, *Acanthamoeba palestinensis* Reich) and *Pseudomonas* sp. **Soil Biology and Biochemistry**, v.3, p.151-155, 1971.

DEAN, R.A. Signal pathways and appressorium morphogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 211-234, 1997.

DÉLYE, C.; CORIO-COSTET, M. F. Rapid isolation of both double-stranded RNA and PCR-suitable DNA from the obligate biotrophic phytopathogenic fungus *Uncinula necator* using a commercially available reagent. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.74, p. 149-153, 1998.

DENG, F.; MELZER, M.S.; BOLAND, G.J. Vegetative compatibility and transmission of hypovirulence-associated dsRNA in *Sclerotinia homoeocarpa*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 24, p. 481-488, 2002.

DENG, F.; XU, R.; BOLAND, G. J. Hypovirulence-associated double stranded RNA from *Sclerotinia homoeocarpa* is conspecific with *Ophiostoma novo-ulmi* mitovirus 3a-Ld. **Phytopathology**, v. 93, p.1407-1414, 2003.

DIAPENINGEN, A. D. V., DEBETS, A. J. M., HOEKSTRA, R. F. Dynamics of dsRNA mycoviruses in black Aspergillus populations. **Fungal Genetics and Biology**,

United Kingdom, v. 43, p. 446-452, 2007.

DING, P.; LIU, Fu-Xiu; XU, Chen-Xian; WANG, Ke-Rong. Transmission of *Cryphonectria hypovirus* to protect chestnut trees from chestnut blight disease. **Biological Control**, v40, p. 9–14, 2007.

EMBRAPA. **Sistema de produção de citros para o Nordeste: Importância econômica**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Citros/CitrosNordeste/importancia.htm>> Acesso em 03 de Agosto de 2008.

FABRIS, J. **Diagnóstico Molecular de *Guignardia citricarpa*, agente causal da Mancha Preta dos Citros**. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

FEICHTENBERGER, E. Pragas e doenças dos citrus. **Frutas e Derivados**. Ano 2, Edição 06. p. 41-43, 2007

FELTRIN, L. J. **Validação de marcador morfológico para identificação do fungo *G. citricarpa***. Curitiba. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

FULBRIGHT, D.W. Effect of elimination dsRNA in hypovirulent *Endothia parasitica*. **Phytopathology**, St. Paul, v.74, p. 722-724, 1984.

FUNDECITRUS. **Pinta Preta ou Mancha Preta dos Citros**. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/pinta_preta.html> Acesso em 03 de Agosto de 2008.

GARBEVA, P.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN VUURDEN, J.W.L.; VAN ELSAS, J.D. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGE) of 16S rDNA based PCR fragments. **Microbial Ecology**, v.41, p.369-383, 2001.

GLIENKE, C. ; CHRISTO, D. de ; STRINGARI, D. ; MACCHERONI JR, W. ; AZEVEDO, J. L. de . High Molecular Diversity of the Fungus *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae* and New Primers for the Diagnosis of the Citrus Black Spot. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 2008.

GLIENKE, C. **Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa***

Kiely detectada por RAPD. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1995.

GLIENKE-BLANCO, C.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; VIEIRA, M. L. C.; BARROSO, P. A. V.; AZEVEDO, J. L. Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from *citrus*. **Genetic and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n.2, p.251-255, 2002.

GOES, A.; FEICHTENBERGER, E. Ocorrência da mancha preta causada por *Phyllosticta citricarpa* (McAlp.) VAN DER AA (*Guignardia citricarpa* Kiely) em pomares cítricos do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 138, 1993.

GOOGLE. **Google Earth 4.3.7284.3916 Beta.** Software, 2008.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, n.10, p.895-914, 1997.

HERBERT, J.A.; GRECH, N.M. A strain of *Guignardia citricarpa*, the citrus black spot pathogen, resistant to benomyl in South Africa. **Plant Disease**, St. Paul, v. 69, p. 1007, 1985.

HINTON, D.M.; BACON, C.E. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. **Mycopathologia**, v.129, p.117-125, 1995.

HOEGGER, P.J.; HEINIGER, U.; HOLDENRIEDER, O.; RIGLING, D. Differential transfer and dissemination of hypovirus and nuclear and mitochondrial genomes of a hypovirus-infected *Cryphonectria parasitica* strain after introduction into a natural population. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.69, n.7, p.3767-3771, 2003.

HOWARD, R.J.; FERRARI, M.A. Role of melanin in aplerisorium function. **Experimental Mycology**, Orlando, v.13, p. 403-418, 1989.

HOWITT, R.L.J.; BEEVER, R.E.; PEARSON, M.N.; FORSTER, R.L.S. Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Botrytis cinerea*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 99, p. 1472-1478, 1995.

IKEDA, K., NAKAMURA, H., ARAKAWA, M., MATSUMOTO, N. Diversity and vertical

transmission of double-stranded RNA elements in root rot pathogens of trees, *Helicobasidium mompa* and *Rosellinia necatrix*. **Mycological Research**. United Kingdom, v. 108, p. 626-634, 2004.

JACOBS, M.J.; BUGBEE, W.M.; GABRIELSON, D.A. Enumeration, location and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. **Canadian Journal of Botany**, v.63, p.1262-1265, 1985.

KAVA-CORDEIRO, V. ***Guignardia citricarpa*, *G. mangiferae* e *Phyllosticta spinarum*: caracterização morfológica, SCARs e RNA dupla fita**. Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004.

KAVA-CORDEIRO, V.; GLIENKE, C.; GALLI-TERASAWA, L.; LANZONI, C.; POSSIEDE, Y.M.; DALZOTO, P.; KITAJIMA, E.W.; AZEVEDO, J.L. Mycoviruses in *Guignardia citricarpa*, *G. mangiferae* and *Phyllosticta spinarum*. **Mycological Research**. United Kingdom, submitted, 2007.

KIM, J. W.; BOZARTH, R. F. Intergeneric occurrence of related fungal viruses: the *Aspergillus ochraceus* virus complex and its relationship to the *Penicillium stoloniferum* virus. **Journal of General Virology**. v66, p1991–2002, 1985.

KOYASHIKI, R. Núcleo de Pesquisa da UEM utiliza biologia molecular para estudar doenças de citros no Estado e foi responsável pela descoberta da incidência da pinta preta no Paraná. Biotecnologia a serviço do campo, **Jornal da UEM online**, nº28, 2006.

KUBO, Y.; TAKAMO, Y.; ENDO, N.; YASUDA, N.; TAJIMA, S.; FURUSAWA, I. Cloning and strutral analysis of the melanin biosynthesis gene SCD1 encoding scytalone dehydratase in *Colletotrichum lagenarium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 12, p. 4340-4344, 1996.

LAKSHMAN, D. K.; TAVANTZIS, S. M. Spontaneous appearance of genetically distinct double-stranded RNA elements in *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v. 84 p.633-639. 1994

MARTINS, E. Z. **RNA dupla fita em *Phyllosticta spinarum*: caracterização e cura**. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

McCABE, P.M.; PFEIFFER, P.; VAN ALFEN, N.K. The influence of dsRNA viruses on the biology of plant pathogenic fungi. **Trends in Microbiology**, Limerick, v. 7, p.

377-381, 1999.

MCFADDEN, J. J. P.; BUCK, K. W.; RAWLINSON, C. J. Infrequent transmission of double-stranded RNA virus particles but absence of DNA proviruses in single ascospore cultures of *Gaeumannomyces graminis*. **Journal of General Virology**, v 64, p. 927–937, 1983.

McONIE, K.C. The latent occurrence in citrus and other hosts of a *Guignardia* easily confused with *G. citricarpa*, the citrus black spot pathogen. **Phytopathology**, St. Paul, v.54, p.40-43, 1964a.

MENEZES, M.; OLIVEIRA, S. M. A. **Fungos Fitopatogênicos**. Recife, p.146-149, 1993.

MERTENS, P. The dsRNA viruses. **Virus Research**, Shannon, v. 101, p. 3-13, 2004.

MONTENEGRO, D. H. **Investigação e caracterização de RNA dupla fita em *Phyllosticta spinarum* e *Guignardia citricarpa***. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the fungi**. 4.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1996.

MUNDT, J.O.; HINKLE, N.F. Bacteria within ovules and seeds. **Applied and Environmental Microbiology**, v.32, p.694-698, 1976.

MURAI, M. Y. **Estudo da variabilidade morfológica e genética de *Guignardia* spp por meio de marcadores moleculares**. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Do Paraná, Curitiba, 2007

NISHIMURA, R. C. **PCR Multiplex na identificação de *Guignardia citricarpa* e *G. mangiferae***. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

NOGAWA, M.; NAKATANI, A.; GONDA, K.; SHIMOSAKA, M.; OKAZAKI, M. Replication of double-stranded RNA in micovírus from the plant pathogenic fungus *Fusarium solani*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 137, p. 45-49, 1996.

NOGAWA, M.; SHIMOSAKA, M.; KAGEYAMA, T.; OKAZAKI, M. A double-stranded

RNA mycovirus from the plant pathogenic fungus, *Fusarium solani* f. sp. *robiniae*. **FEMS Microbiology Letters**, v 110, p153–158, 1993.

NUNES, W. M. C. Ocorrência de pinta preta, causada por *Guignardia citricarpa*, em tangerinas 'Montenegrina' no sul do Paraná. **Summa Phytopathologica**. Botucatu, SP, v32, nº3, p. 295, Julho/Setembro de 2006.

NUSS, D. L. Biological control of chestnut blight : an example of virus-mediated attenuation of fungal pathogenesis. **Microbiological Reviews**, v56, p.561–576, 1992.

OKANE, I.; NAKAGIRI, A.; ITO, T. Identity of *Guignardia* sp. Inhabiting ericaceous plants. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 79, p.101-109, 2001.

PANDEY, A.K.; REDDY, M.S.; SURYANARAYANAN, T.S. ITS-RFLP and ITS sequence analysis of a foliar endophytic *Phyllosticta* from different tropical trees. **Mycological Research**, Cambridge, v.107, n.4, p.439-444, 2003.

PAPAZOVA-ANAKIEVA, I.; SOTIROVSKI, K.; CORTESI, P.; MILGROOM, M. G. Horizontal transmission of hypoviruses between vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* in Macedonia. **European Journal Plant Pathology**, v120,p. 35–42, 2008.

PARK, Y., CHEN, X., AND PUNJA, Z. K. Molecular and biological characterization of a mitovirus in *Chalara elegans* (*Thielaviopsis basicola*). **Phytopathology** 96:468-479. 2006.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Eds.). **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer-Verlag, p.179-197, 1991.

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: FOKKEMA, N.J.; HEUVEL, J. VAN DEN (Eds.), **Microbiology of the Phyllosphere**, Cambridge, U.K. Cambridge University Press, 1986, p. 175-187.

PFEIFFER, I.; LITTER, J.; PÉNZES, Z.S.; KUCSERA, J. Effects of double-stranded RNA viruses on the reproduction of *Phaffia rhodozyma*. **Acta Biologica Hungarica**, Budapest, v. 52, p. 299-306, 2001.

PUNJA, Z.K. Influence of double-stranded RNA on growth, sporulation,

pathogenicity, and survival of *Chalara elegans*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. 1001-1009, 1994.

QUADT-HALLMANN, A.; HALLMANN, J.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, n.3, p.254-259, 1997.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 1, p. 17-20, 1985.

RIBEIRO, L. A. de **Variabilidade Genética por RAPD em fungos endófitos de Gênero *Penicillium*, provenientes de *Zea mays* L.** 90 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

ROBBS, C. F. A mancha preta dos frutos cítricos (*Phyllosticta citricarpa*): ameaça a citricultura paulista. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 11, n. 1, p. 75-86, 1990.

ROBBS, C. F.; BITTENCOURT, A. M. A mancha preta dos frutos: um dos fatores limitantes `a produção citrícola do estado do Rio de Janeiro. **Comunicado Técnico – CTAA-EMBRAPA**, n. 19, p. 1-5, 1995.

ROBBS, C. F.; PIMENTEL, J. P.; RIBEIRO, R. L.D . A mancha preta causada por *Phoma citricarpa*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 5, p. 455, 1980.

ROBIN, C.; HEINIGER, U. Chestnut blight in Europe: Diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. **Forest Snow and Landscape Research**, v. 76, n. 3, p. 361-367, 2001.

ROBINSON, H.L.; DEACON, J.W. Double-stranded RNA elements in *Rhizoctonia solani* AG3. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 12-22, 2001.

ROGERS, H. J.; BUCK, K.W. Transmission of double-stranded RNA and a disease factor in *Ophiostoma ulmi*. **Plant Pathology**, v35, p.277–287, 1986.

ROMO, M, LEUCHTMANN, A., GARCÍA, B., ZABALGOGUEAZCOA, I. A totivirus infecting the mutualistic fungal endophyte *Epichlōe festucae*. **Virus Research**, United Kingdom, v 124, p. 38-43, 2007.

SHAW, B.D.; KUO, K.; HOCH, H.C. Germination and apressorium development of

Phyllosticta ampellicida pycnidiospores. **Mycologia**, Lawrence, v.90, n.2, p. 258-268, 1998.

SHELBOURN, S.L.; DAY, P.R.; BUCK, K.W. Relationships and functions of virus double-stranded RNA in a P4 Killer Strain of *Ustilago maydis*. **Journal of General Virology**, Reading, v. 69, p. 975-982, 1988.

SILVA, T. M e. **RNA dupla fita em *Guignardia citricarpa*, e estimativa do número de cromossomos em *G. citricarpa*, *G. mangiferae* e *Phyllosticta spinarum***. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SIVANESAM, A. **The bitunicate Ascomycetes and their anamorphus**. Berlin: J. Cramer, 701p, 1984.

SPÓSITO, E; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Edusc, 510p, 2004.

STONE, J.K. Fine structure of latent infections by *Rhabdocline parkeri* on Douglas-fir, with observations on uninfected epidermal cells. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.66, p.45-54, 1998.

STRINGARI, D. **Estudo da variabilidade genética de *Guignardia* spp por meio de marcadores RAPD e seqüências ITS**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004,

STRYER, L. **Biochemistry**. 3rd edn. W. H. Freeman, New York, 1988.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; MATHESON, B. G.; ARSENAULT, W. J.; BUCHANAN, N.A. Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. **Plant Pathology**, v.48, p.360-369, 1999.

VARGA, J.; RINYU, E.; KEVEI, E.; TOTH, B.; KOZAKIEWICZ, Z. Double-stranded RNA mycoviruses in species of *Aspergillus* sections Circumdati and Fumigati. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, p. 569-574, 1998.

VIRET, O.; PETRINI, O. Colonization of beech leaves (*Fagus sylvatica*) by the endophyte *Discula umbrinella* (teleomorph: *Apiognomonina errabunda*).

Mycological Research, v. 98, p. 423-432, 1994.

WHITE Jr., J. F.; MORGAN-JONES, G.; MORROW, A.C. Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of *Acremonium* endophytes. **Agriculture Ecosystem & Environment**, v. 44, p.13-37, 1993.

WICKNER, R. B. Double-stranded RNA viruses of yeast. **Microbiological Reviews**, v60, p.250–265, 1996.

WICKNER, R. B. Double-stranded and single-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 46, p. 347-75, 1992.

WOLOSHUK, C. P.; SISLER, H. D. Tricyclazole, pyroquilon, tetrachlorophthalide, PCBA, coumarine and related compounds inhibit melanization and epidermal penetration by *Pyricularia oryzae*. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 7, p. 161-166, 1982.